

水産総合研究センター 研究報告

36

平成24年1月

**BULLETIN OF
FISHERIES RESEARCH AGENCY**

No. 36
January 2012

Library
Pacific Islands Fisheries Science Center
NOAA Fisheries
Received 18 Apr 2012



独立行政法人 水産総合研究センター
神奈川県横浜市
FISHERIES RESEARCH AGENCY
Yokohama, Kanagawa, Japan

水産総合研究センター研究報告

第 36 号

平成24年 1 月

目 次

(博士号論文)

Studies on the evaluation of the effect of endocrine disrupting chemicals using transgenic see-through medaka (*Oryzias latipes*), *olvas-GFP/STII-YI* strain
羽野健志 1

クルマエビのホワイтスポット病 WSD (white spot disease) の防除対策に関する研究
佐藤 純 57

飼育条件下におけるタイマイの繁殖に関する生態、行動および生理学的研究
小林真人 107

(和文要旨) 143

水産研究・教育機構年報

第14巻

2012

目 次

(文部科学省)

水産研究・教育機構の概要

1

2

3

4

Digitized by the Internet Archive
in 2026

5

6

Studies on the evaluation of the effect of endocrine disrupting chemicals using transgenic see-through medaka (*Oryzias latipes*), *olvas-GFP/STII-YI* strain^{*1}

Takeshi HANO^{*2}

Abstract : In the past few years, general concerns about the release of endocrine disrupting chemicals (EDCs) into the environment have increased because of their potential to cause adverse physiological effects in wildlife. In particular, estrogenic potential of certain chemicals have been shown to interfere with the sexual development and reproduction of fish. Evaluation of chemicals using intact fish is an important and available approach for monitoring and assessing the risks of chemical exposure, however, it requires labor-intensive, expensive, and time-consuming work. To solve this problem, an approach using transgenic fish has been proposed as a facilitated screening test model to evaluate the effect of EDCs because it may have the potential to provide *in vivo* biomonitoring and on-time and on-site evaluation of the effects of EDCs. This study was performed to evaluate the effects of estrogenic chemicals using transgenic see-through medaka (*Oryzias latipes*), *olvas-GFP/STII-YI* strain, which contains the green fluorescent protein (GFP) gene fused to the regulatory region of the medaka *vasa* gene, and germ cell-specific expression of GFP can be visualized in living individuals. We exposed transgenic medaka to known doses of estrogen-mimicking chemicals and examined whether the effects on sexual differentiation including germ cell proliferation and matured gonad could be detected using GFP fluorescence.

Prior to the chemical exposure, we had observed that the number of GFP-fluorescent germ cells and area of GFP fluorescence in normal XX females was about 10 times that in normal XY males at 10 days posthatch (dph). These results showed that sexual dimorphism could be detected on approximately the day of hatching using GFP fluorescence, and further indicated that alterations in sexual differentiation by EDCs could be determined by just with a single slice of image of gonads as early as 10days.

In the first chemical exposure, we examined the effect of 17 α -ethinylestradiol (EE₂), a representative estrogen-mimicking chemical, on sexual differentiation after *in ovo* and waterborne exposures. *In ovo* exposure was performed using a nanoinjection method in which chemicals were directly injected into the embryo. Embryos (within 8 h after fertilization) were nanoinjected with 0.1, 0.5, 2.5, or 5.0 ng of EE₂ and results indicated that some 10-dph, XY males from embryos injected with 0.5 ng EE₂ showed a larger fluorescent area and more germ cells than those of control. At 100 dph, complete male to female sex reversal occurred in ≥ 0.5 ng treatments. In waterborne exposure experiment, from 0 dph onwards, juveniles were exposed to graded concentrations of EE₂ (25.2, 45.1, 80.1, 158, 447, 880, or 1710 ng/L) for 35 days. The gonadal size of 10 dph males that had been exposed to 158 ng/L of EE₂ significantly increased up to twice the size of control males. At 35dph, male to female sex reversal occurred at EE₂ exposure ≥ 45.1 ng/L. These results suggest that enhanced germ cell proliferation in males indicated the occurrence of abnormal sexual differentiation

2011年5月27日受理 (Received, May 27, 2011)

^{*1} 九州大学審査学位論文 (Ph.D. Thesis, Kyushu University) (掲載に際し投稿規定に沿って一部修正した)

^{*2} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5

(National Research Institute of Fisheries and Inland Sea, 2-17-5, Maruishi, Hatukaichi, Hiroshima 739-0452, Japan)

toward females and that observation of proliferative activity of germ cells by GFP fluorescence can be applied to facilitated screening fish model to detect adverse effects on sexual differentiation as early as 10 dph juveniles.

To assess further potential of the *olvas-GFP*/STII-YI strain, mature medaka at 60 dph were exposed to EE₂ (47.8, 94.8, 216, or 522 ng/L) for 4 weeks. The gonads showed a significant reduction of the GFP-fluorescent area in males exposed to EE₂ at >216 ng/L and histologically, high connective tissue prevalence were observed at ≥ 216 ng/L. Next, mature male medaka were exposed to EE₂ (43.7, 85.8, 215, or 473 ng/L) for 3 weeks and allowed to depurate for 6 weeks, to investigate persistent effects of EE₂. Continuous gonad observation showed that GFP began to decline 3 weeks after initial exposure to ≥ 215 ng/L. After depuration, the gonad's fluorescent areas gradually recovered, with no statistical difference at the end of the depuration period; normal spermatogenesis was present in these individuals. These results showed that the condition of the gonad can clearly be described by GFP fluorescence and that abnormal changes of the gonad can be detected by just with a single slice of images of the gonad even in 60dph adult medaka.

Overall, the present study clearly showed that the transgenic line test model can provide a more practical choice of the evaluation for the effect of EDCs and could be a promising noninvasive approach to identify the effects of chemicals on the gonad. Although we investigated a few chemicals only, further studies to investigate a variety of chemicals will elucidate the usefulness of *olvas-GFP*/STII-YI strain as a facilitated screening fish model to detect EDC-induced abnormalities.

Key words : transgenic medaka, endocrine disrupting chemicals, germ cell, Green fluorescent protein, sexual differentiation

Contents

Chapter 1. General Introduction

Chapter 2. Detection of sexual dimorphism as estimated by proliferative activity of germ cells in the *olvas-GFP*/STII-YI strain

2.1. Introduction

2.2. Materials and Methods

2.3. Results and Discussion

Chapter 3. Effect of 17 α -ethinylestradiol on sexual differentiation in the *olvas-GFP*/STII-YI strain

3.1. Introduction

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Nanoinjection exposure

3.2.2. Waterborne exposure

3.2.3. Statistical analysis

3.3. Results

3.3.1. Nanoinjection exposure

3.3.2. Waterborne exposure

3.4. Discussion

Chapter 4. Effect of *in ovo* exposure of nonylphenol on sexual differentiation in the *olvas-GFP*/STII-YI strain

4.1. Introduction

4.2. Materials and Methods

4.3. Results

4.4. Discussion

Chapter 5. Effect of 17 α -ethinylestradiol on matured gonad in the *olvas-GFP*/STII-YI strain

5.1. Introduction

5.2. Materials and Methods

5.2.1. Direct waterborne exposure

5.2.2. Waterborne exposure followed by depuration

5.2.3. Statistical analysis

5.3. Results

5.3.1. Direct waterborne exposure

5.3.2. Waterborne exposure followed by depuration

5.4. Discussion

Chapter 6. General Discussion

Reference

Acknowledgement

Chapter 1. General Introduction

For decades, human beings have been generating abundant synthetic chemicals. These chemicals have been discharged into the environment, reaching water bodies and becoming concentrated in the tissues of aquatic organisms, including fish. The lethal, sublethal, and other physiological effects of these compounds endanger the survival of these organisms. Although the use and disposal of chemicals has been regulated, concern over the potential impact of natural steroid hormones and endocrine disrupting chemicals (EDCs) on aquatic organisms has been heightened after finding that these compounds can adversely affect sexual development and reproduction in wildlife (Colborn *et al.*, 1993; Stone, 1994). The evaluation of chemicals using fish is an important and available approach for monitoring and assessing the risks of chemical exposure (Guillette *et al.*, 1994; Jobling *et al.*, 1998).

Field studies have examined estrogenic and androgenic response in aquatic organisms, altered hormone levels in fish, and induction of imposex in gastropods. Estrogen-related responses in male fish include altered serum steroid levels and delayed gonadal maturation in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) living near pulp mills (Munkittrick *et al.*, 1992); abnormally elevated vitellogenin (Vtg; a precursor of egg yolk protein) concentrations and reduced serum testosterone in male carp (*Cyprinus carpio*) captured near sewage treatment plants (Folmar *et al.*, 1996); and a high prevalences of intersex gonads in roach (*Rutilus rutilus*) and gudgeon (*Gobio gobio*) collected near sewage treatment plants (Jobling *et al.*, 1998; Van Aerle *et al.*, 2001) and male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from contaminated estuaries (Hashimoto *et al.*, 2000). These abnormalities in wild fish might be caused by natural (17β -estradiol and estrone) and synthetic estrogens (17α -ethinylestradiol (EE₂), nonylphenol (NP), and bisphenol-A (Desbrow *et al.*, 1998; Körner *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2001).

Masculinization has also been reported in some

fish species exposed to effluents from pulp and paper mills (Howell *et al.*, 1980; Hegrenes, 1999). Another endocrine disruption in wildlife is the induction of imposex in gastropods, which is defined as an irreversible syndrome imposing male-type genital organs upon females, collected from tributyltin and triphenyltin polluted sites (Horiguchi *et al.*, 1997). Reduced serum concentrations of thyroxine were reported in fish sampled from sites contaminated with polychlorinated biphenyl (PCB) congeners in the San Francisco Bay (Brar *et al.*, 2010).

EDCs have been studied extensively in the laboratory for their estrogenic potencies in standard test fish including medaka (*Oryzias latipes*), fathead minnow (*Pimephales promelas*), and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus* Lacépède). For example, deleterious effects of EE₂ and NP include skewed sex ratio toward females (Lange *et al.*, 2001; Scholz and Gutzeit, 2000; Yokota *et al.*, 2001; Zillioux *et al.*, 2001), induction of intersex gonad and Vtg (Harries *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003), reproductive impairment (Seki *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003), and decreased hatchability and failed swim-up of hatched larvae (Yokota *et al.*, 2001). In addition to estrogen-related chemicals, other compounds are known to show binding affinity to the androgen receptor and act as both androgen agonist (e.g., methyltestosterone; Seki *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2008) and antagonists (e.g., DDT metabolite *p,p*-DDE (Kelce *et al.*, 1995), the fungicide vinclozolin (Gray *et al.*, 1994), and the anticancer agent flutamide (Jensen *et al.*, 2004)). TBT was also reported to cause masculinization in Japanese flounder, (*Paralichthys olivaceus*; Shimasaki *et al.*, 2003) and abnormal development in medaka embryos (Hano *et al.*, 2007).

A variety of *in vitro* and *in vivo* tests have been developed for evaluating the effects of EDCs. Most of the *in vitro* methods are cell-based, including receptor binding assays (Folmar *et al.*, 2002), cell proliferation assays (Jones *et al.*, 1998; Metcalfe *et al.*, 2001), and reporter gene assays (Kojima *et al.*, 2004). They are relatively simple, high-throughput, sensitive, and quantifiable (Zeng *et al.*, 2005). However, the effects of metabolic conversion, which occurs with NP (Gigar *et al.*, 1984), and/or bioconcentration are not considered; therefore,

these tests may fail to correlate *in vitro* effects to effects on whole organisms. Another problem is the differential affinity of certain estrogen receptors for the compounds of interest. Furthermore, *in vitro* assays could potentially result in false-negative evaluations of chemicals (Folmar *et al.*, 2002). In contrast, commonly used *in vivo* assays expose test organisms to known doses of chemicals to evaluate their effects at target physiological endpoints, such as reproduction, sexual differentiation, and abnormal induction or suppression of sex-specific proteins (e.g., Vtg) or endogenous hormones. *In vivo* assays are, however, generally low-throughput because they require labor-intensive, expensive, and time-consuming work (Zeng *et al.*, 2005). Thus, novel fish test models that combine the advantages of both *in vitro* and *in vivo* assays are desirable. Transgenic fish models have the potential to answer these demands because they can provide *in vivo* biomonitoring and on-time and on-site evaluation of the effects of EDCs using reporter genes such as green fluorescent protein (GFP) under the inducible promoters of targeted, tissue-specific genes. GFP is a photoprotein of the bioluminescent jellyfish *Aequorea victoria*, which emits green fluorescence when excited by blue light.

Transgenic organisms are used in biological research, drug production, agriculture, and aqua farming. In the mid 1970s, transgenic animals were first generated by adding foreign genes to the genome of an animal (Jaenisch *et al.*, 1974). In mammals, transgenic mice were first developed to study tissue-specific responses to disease, — for example, limb deformity (Woychik *et al.*, 1985), embryonic lethal mutation (Harbers *et al.*, 1984), inactivation of the X chromosome (Krumlauf *et al.*, 1986), and carcinogenesis (Adams *et al.*, 1985) — at an individual and molecular biological level. In fish, medaka has been first proven to be a useful model for studies of transgenic fish since the transgenic medaka expressing the chicken δ -crystallin gene was produced in 1986 (Ozato *et al.*, 1986).

Molecular and biological approaches using transgenic organisms are also applied to elucidate the mechanisms of sexual differentiation. As a result of studies in transgenic mice, the *SRY/Sry* gene was identified as a sex-determining gene (Sinclair

et al., 1990; Koopman *et al.*, 1991), and various factors including *DAX1* (Swain *et al.*, 1998), *M33* (Kato-Fukui *et al.*, 1998), *ARX* (Kitamura *et al.*, 2002), and *SOX9* (Vidal *et al.*, 2001) were found to be involved in sexual differentiation. As for nonmammalian vertebrates, Matsuda *et al.* (2002) cloned *DMY* (*Doublesex* and *Mab-3* domain gene on the Y chromosome) from the sex-determining region on the Y chromosome of medaka and further established a transgenic medaka line overexpressing *DMY* cDNA under the control of the cytomegalovirus promoter and demonstrated that *DMY* is sufficient for male development in medaka and is an additional sex-determining gene in vertebrates (Matsuda *et al.*, 2007).

Several GFP transgenic lines have been generated using tissue-specific promoters. The fluorescence is stable, and virtually no photobleaching occurs. Because GFP requires no exogenous substrates or cofactors for fluorescence emission, it provides an excellent means for monitoring gene expression and protein localization in living organisms. Since the cloning of GFP cDNA by Prasher *et al.* (1992), the usefulness of GFP as a reporter gene has been proved in transgenic animals such as *Caenorhabditis elegans* (Chalfie *et al.*, 1994), *Drosophila melanogaster* (Wang and Hazelriggs, 1994), mice (Ikawa *et al.*, 1995), zebrafish (*Zebra danio*; Amsterdam *et al.*, 1995), and medaka (Hamada *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 2000).

Medaka is one of most popular fish species in Japan and one of the most extensively studied because it matures and reproduces quickly (approximately 3 months), is highly fecund (20–30 eggs/day), exists in a variety of strains, has a small genome size, and requires only a small facility to maintain. These properties render medaka useful in many fields of study, including biology, genetics, radiology, and pathology. Medaka is also known to be a differentiated gonochorist (Aida, 1921) and is therefore not expected to show spontaneous intersexuality. Sexual dimorphism first appears soon after hatching, when male and female phenotypes can easily be distinguished by the proliferative activity of germ cells (Satoh and Egami, 1972). Germ cells in the female gonads enter meiosis on approximately the day of hatching, whereas germ

cells in the male gonad undergo meiotic arrest (Sato and Egami, 1972; Kobayashi *et al.*, 2004). This distinction facilitates sex determination in very young fry as well as the detection of abnormal sexual differentiation caused by EDCs. Owing to these advantageous physiological and sexual traits, medaka is an attractive model organism for toxicological testing of acute or chronic toxicity (Weber *et al.*, 2004), reproduction (Kang *et al.*, 2002, 2003, 2006, 2008; Seki *et al.*, 2002), life cycle (Yokota *et al.*, 2001; Seki *et al.*, 2004), behavior (Oshima *et al.*, 2002), early life (Yokota *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2003), and nanoinjection (Edmunds *et al.*, 2000; Papoulias *et al.*, 2000a, 2000b). Hence, medaka is a proposed standard test fish in the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines (1999).

Transgenic fish models for the monitoring environmental pollution have been developed using zebrafish and medaka because of their excellent performance in fish toxicological studies and their rich genome information. In zebrafish, Mattingly *et al.* (2001) reported a GFP transgenic line using the human *CYP1A1* promoter that is capable of responding to TCDD (2, 3, 7, 8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin) and thus may be used as a biomonitoring system for detecting xenobiotic toxicants in the environment. Blechinger *et al.* (2002) used a heat-shock-inducible hsp70: GFP transgenic zebrafish line to study cadmium toxicity and demonstrated cadmium-inducible GFP expression that can be used in biomonitoring systems. Kurauchi *et al.* (2005) produced a transgenic medaka line harboring the GFP gene driven by a regulatory region of the choriogenin H gene, one of the precursors to egg envelope proteins (Murata *et al.*, 1997). They observed GFP expression in the liver of male medaka in response to estrogens and indicated that the transgenic line was sufficient for application as an alternative model in monitoring environmental water samples. Other transgenic lines for this use have been established using choriogenin L (Ueno *et al.*, 2004) and medaka Vtg-1 (Zeng *et al.*, 2005).

In 2001, Tanaka *et al.* established a transgenic medaka line by microinjecting an *olvas-GFP* construct containing the coding region of the GFP gene fused to the regulatory regions of the medaka

homolog of the *Drosophila vasa* gene (*olvas*, from *Oryzias latipes vasa*) (Fig. 1-1), and demonstrated GFP expression exclusively in the germ cells of medaka (Shinomiya *et al.*, 2000). This line is the first model to visualize germ cells using GFP fluorescence and offer a useful model for analyzing gonadal development in a living vertebrate. A drawback of this model, however, is that direct observation with the naked eye is possible only during juvenile stages because the peritoneum is covered with pigments such as iridophore and melanophore (Wakamatsu *et al.*, 2001) during the later stages of life. To solve the problem, Wakamatsu *et al.* (2001) generated a see-through (STII) medaka that is transparent throughout its life (Fig. 1-2), by genetically removing most of the pigments from the entire body of the organism using a combination of recessive alleles at 4 loci (melanophores, iridophores, leucophores, and xanthophores).

The *olvas-GFP*/STII-YI strain used in this study was produced by introducing *olvas-GFP* into the genome of STII medaka. In this strain, germ-cell-specific expression was confirmed by the observation of GFP through the transparent body wall of the living fish throughout life. Furthermore, matured testes and ovaries are easily distinguishable with the naked eye under fluorescence microscopy (Fig. 1-3). The apparent sexual dimorphism of the gonads indicated by GFP fluorescence can also provide a useful indicator of the effect of environmental substances on gonadal development.

This strain carries 2 genotypic sex markers: leucophore (*lf*; Wakamatsu *et al.*, 2003) and sex-linked 1 (*SL1*; Matsuda *et al.*, 1997). The leucophore marker appears in the skin of 2-day-old males but not in that of females (Fig. 1-4). The *SL1* DNA marker, which exists on sex chromosomes, is detected as 1 band in females and as 2 bands in males, using agarose electrophoresis after polymerase chain reaction (PCR) (Fig. 1-5). Therefore, we can use these markers to discriminate genotypic males (XY) from genotypic females (XX), which facilitates the detection of abnormal sexual differentiation caused by EDCs.

In this study, EE₂ and NP were selected as test chemicals (Fig. 1-6) due to their estrogenic potency (Folmar *et al.*, 2002). Because they have been

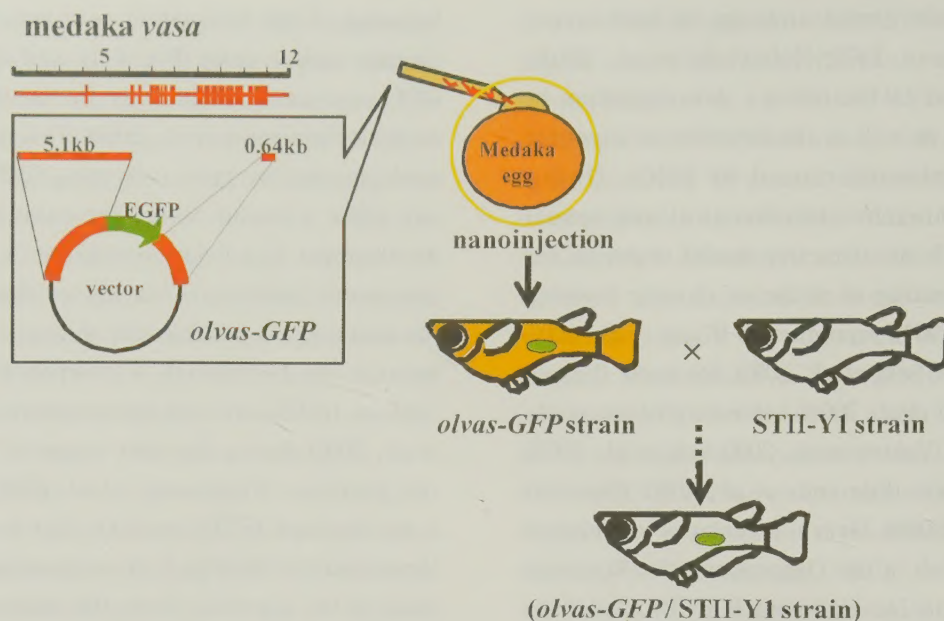


Fig. 1-1. Establishment of the *olvas-GFP/STII-Y1* strain. GFP, green fluorescent protein; STII, see-through II.(Tanaka *et al.*, 2001; Wakamatsu *et al.*, 2001)

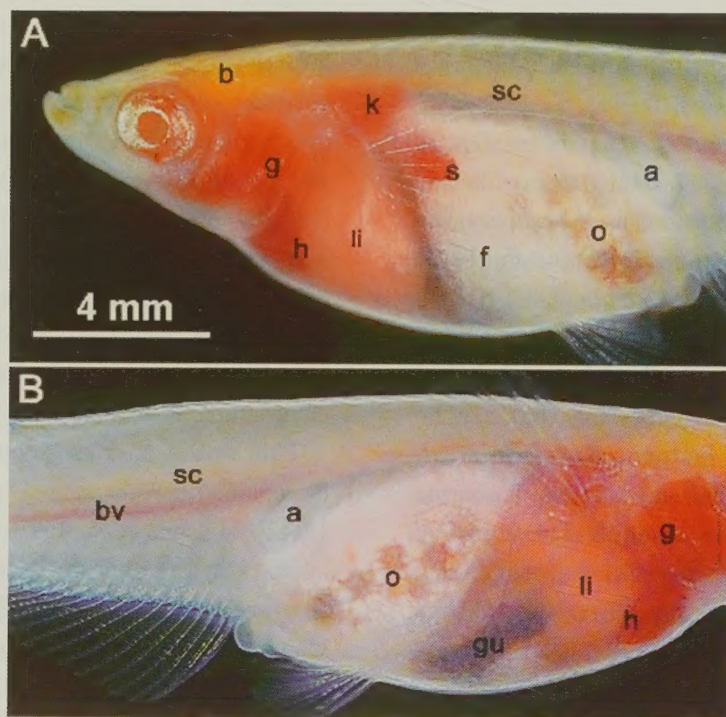


Fig. 1-2. The left (A) and right (B) sides of a female see-through medaka. The dark color of the gut comes from ingested food. a, air bladder; b, brain; bv, blood vessels; f, fat tissue; g, gill; gu, gut; h, heart; k, kidney; li, liver; o, ovary; s, spleen; sc, spinal cord. Reprinted from Wakamatsu *et al.* (2001).

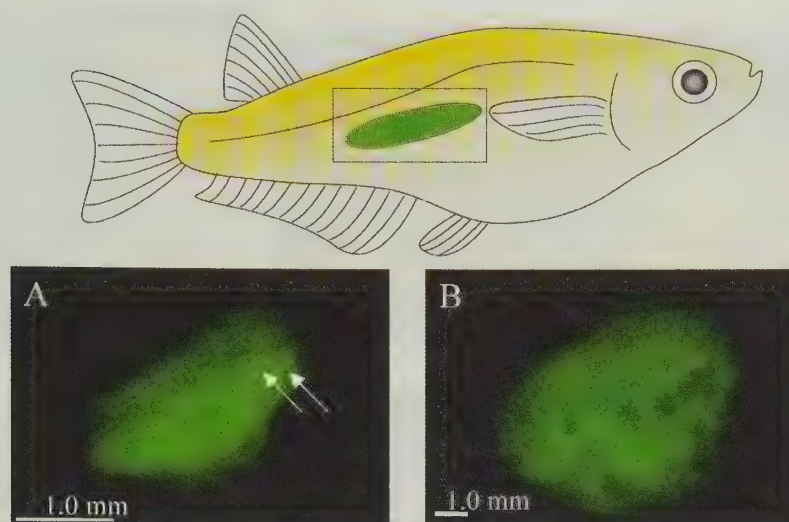


Fig. 1-3. Right lateral sides of gonads demonstrating green fluorescent protein (GFP) in *olvas-GFP/STII-YI* adults. (A) testis, and (B) ovary; arrow: leucophore, a male-specific pigment. STII, see-through II.

detected in aquatic environment, they are suspected causes of estrogenic effects observed in wild fish (Holthaus *et al.*, 2002).

EE₂ is used in contraceptive formulations (Folmar *et al.*, 2002) and has been detected in surface waters and sewage treatment plant effluents. The concentrations of EE₂ in river surface waters were relatively low—a few nanograms per liter (Belfoid *et al.*, 1999). Adverse effects of EE₂ demonstrated in laboratory experiments include sex-reversal followed by a skewed sex ratio toward females, Vtg induction, and intersex gonads in male fish at extremely low concentrations. Skewing of the sex ratio toward females was observed in medaka exposed to 100 ng/L for 2 months (Scholz and Gutzeit, 2000), in fathead minnow exposed to ≥ 4.0 ng/L for 56 days (Lange *et al.*, 2001), and in sheepshead minnow exposed to ≥ 200 ng/L for 73 days (Zillioux *et al.*, 2001). Purdom *et al.* (1994) found that a 10-day immersion exposure of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to EE₂ induced the dose-dependent Vtg response, ranging from 0.1 to 10 ng/L. Metcalfe *et al.* (2001) reported that the lowest observable effective concentration (LOEC) for testis-ova induction in male medaka during 100 days of exposure was 0.1 ng/L, which was well within the concentrations detected in many sewage treatment plant effluents. EE₂ also impaired reproduction in

adult medaka at concentrations of 488 ng/L for 21 days and induced a high prevalences of connective tissue in male testes (Seki *et al.*, 2002).

Nonylphenol ethoxylates (NPEOs) are widely used as cleaning agents and nonionic surfactants in a variety of industrial and agricultural processes (Tolls *et al.*, 1994). They are relatively hydrophilic and nontoxic (Giger *et al.*, 1984), but their bacterial degradation product, nonylphenols, are toxic and hydrophobic compounds produced mainly during sewage treatment. Nonylphenols have been detected at microgram-per-liter levels in the aquatic environment (Rudel *et al.*, 1998; Blackburn *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2000). Several *in vivo* studies have confirmed that NP has physiological and developmental effects related to its estrogenic potency. Reproductive failure and testis-ova induction as well as elevated Vtg have been observed in NP-exposed medaka (Kang *et al.*, 2003) and fathead minnow (Harries *et al.*, 2000). Exposure of medaka to NP for 60 days beginning at 0 days post-fertilization resulted in a significant decrease in hatchability and successful swim-up of hatched larvae at concentrations of 183 μ g/L (Yokota *et al.*, 2001) and skewed the sex ratio toward females at 23.5 μ g/L (Seki *et al.*, 2003). In a full life cycle test using medaka, Yokota *et al.* (2001) showed that NP induced testis-ova in both parental medaka (F_0) at

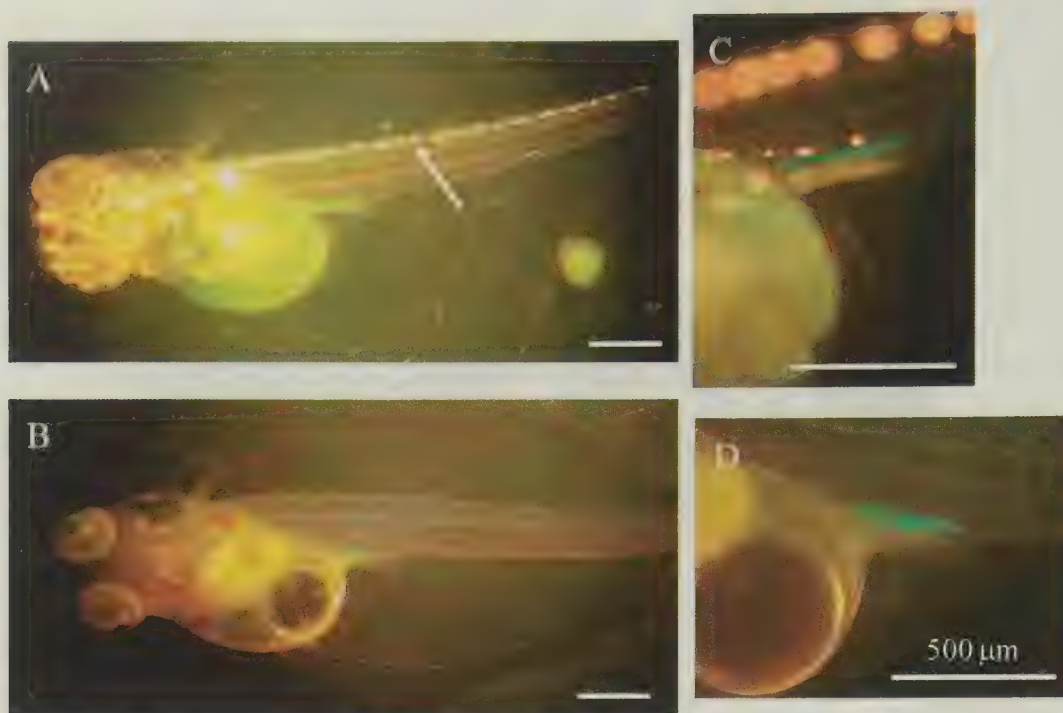


Fig. 1-4. One day posthatch (A) genotypic male and (B) genotypic female juveniles of *olvas-GFP/STII-YI* strain. Magnified image of (C) genotypic male and (D) genotypic female, arrow: leucophore, a male-specific pigment. GFP, green fluorescent protein; STII, see-through II.

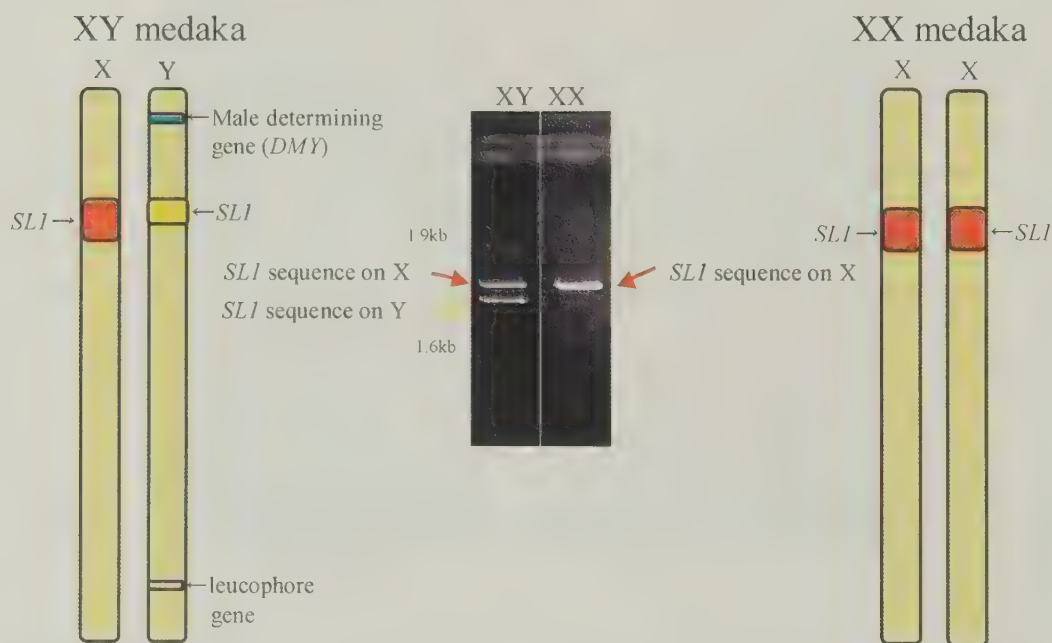


Fig. 1-5. Identification of genotypic sex by detecting a sex-linked 1 (*SLI*) marker sequence in the *olvas-GFP/STII-YI* strain.

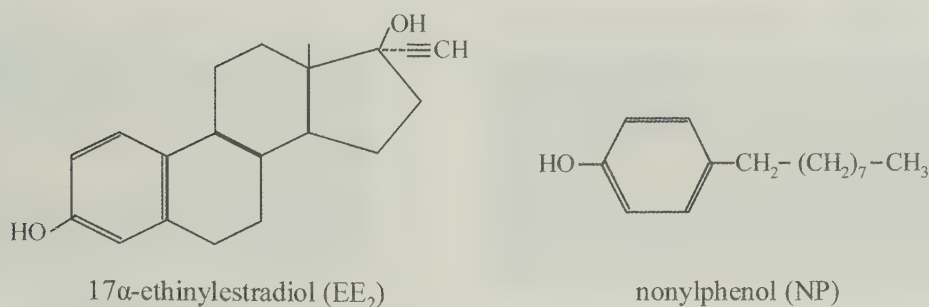


Fig. 1-6. Structural formula of test chemicals used in this study.

$\geq 17.7 \mu\text{g/L}$ and their progeny (F_1) at $\geq 8.2 \mu\text{g/L}$. Given these findings, EE₂ and NP could be major contributors to the estrogenic response observed in fish exposed to sewage treatment plant effluents.

In this study, we aimed to evaluate the application of *olvas-GFP/STII-YI* strain to models for detecting the effect of EDCs. The transgenic medaka were exposed to known doses of contaminants, and we examined whether effects on sexual differentiation including germ cell proliferation and matured gonad could be detected using GFP fluorescence. To assess the potential of the *olvas-GFP/STII-YI* strain, we used a four-part experiment: first, we established a method to monitor sexual dimorphism on approximately the day of hatching using GFP fluorescence. Second, we examined the effect of EE₂ on sexual differentiation after *in ovo* and waterborne exposures. *In ovo* exposure was performed using a nanoinjection method in which chemicals were directly injected into the embryo. Third, we examined the effect of NP on sexual differentiation and embryonic development after via *in ovo* exposure. Finally, we examined the effects of EE₂ on the gonads of mature, living medaka and the recovery of the fluorescent area in the testis after the transfer of exposed males to clean water.

Chapter 2. Detection of sexual dimorphism as estimated by proliferative activity of germ cells in the *olvas-GFP/STII-YI* strain

2.1. Introduction

In medaka (*Oryzias latipes*), male and female phenotypes can first be distinguished by the proliferative activity of germ cells on approximately the day of hatching (Satoh and Egami, 1972). Germ

cells in female fry enter meiotic cell division within 24 h after hatching, whereas in males, germ cells proliferate much later —15 days posthatch (dph)— which facilitates sexing very young fry. However, detection of the sexual dimorphism in the normal fish has the demand for preparing the serial sections to count the germ cell numbers, which is generally labor-intensive and time-consuming work. Here, we established a facilitated method to detect sexual dimorphism by both calculating GFP-fluorescent germ cells and measuring the area of green fluorescent protein (GFP) fluorescence in the *olvas-GFP/STII-YI* strain.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Test organism

The *olvas-GFP/STII-YI* strain was provided by Y. Wakamatsu, Bioscience Center, Nagoya University, Japan and was bred in our laboratory. Each pair was placed in a 2-L glass chamber (20 × 10 × 15 cm) filled with static water at 25–27°C. The fish were kept under a constant 16:8-h light:dark photoperiod and were fed with *Artemia* nauplii (< 24 h after hatching) twice a day. Half the water was replaced once a day with dechlorinated tap water.

2.2.2. Determination of genotypic sex

As mentioned in Chapter 1, this strain carries 2 genotypic sex markers: leucophore (*lf*; Wakamatsu *et al.*, 2003) and sex-linked 1 (*SLI*; Matsuda *et al.*, 1997). However, the recombination frequency between the *lf* locus, which determines leucophore expression in the skin, and sex-determinant (*SD*) locus is about 1.4% in FLF stock and 4.2% in FLFII stock (Wakamatsu *et al.*, 2003), that is, an error of

1.4–4.2% is unavoidable in sex identification based on this color marker. In contrast, *SLI* is known to closely link to the *SD* locus (Wakamatsu *et al.*, 2003). Because of the close linkage of the *SLI* locus to the *SD* locus, identification of genotypic sex in each individual was performed with polymerase chain reaction (PCR) analysis of *SLI*.

SLI sequence was amplified according to the methods of Matsuda *et al.*, (1997) with slight modifications. After removal of the gonad from each specimen, part of the caudal fin (approximately 1 × 1 mm) was excised with a razor, and DNA was extracted from the piece of fin with a Dneasy Tissue kit* (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Amplification of the *SLI* gene was carried out by PCR. PCR primers were sense (5'-CCT GCA ATG GGA AAT TAT TCT GCT C3') and antisense (5'-CTT TTG TGT CTT TGG TTA TGA AAC GAT G-3'). The reaction mixture was composed of 25 μ L of 10× Ex Taq Buffer (Takara, Tokyo, Japan), 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ M dNTPs, 0.2 μ M of each primer, 1 μ L of template DNA, and 0.6 unit of Ex Taq polymerase (Takara, Tokyo, Japan) in a final volume of 25 μ L. The thermal cycling involved 30 repeats of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 57°C for 60 s, and extension at 90°C for 120 s. The *SLI* genotype was identified by electrophoresis on a 2% agarose gel.

2.2.3. Measurement of GFP area and counting the number of germ cells in GFP-positive juvenile

Embryos were collected from breeding females in the morning, and healthy embryos were selected. The embryos were sterilized in 0.9% H₂O₂ for 10 min to minimize the likelihood of fungal and bacterial infections and washed with embryo rearing medium (0.1% NaCl, 0.003% KCl, 0.004% CaCl₂·2H₂O, 0.008% MgSO₄ adjusted to pH 7.0–7.2 with NaHCO₃ dissolved in deionized water) and hatched juveniles were maintained in dechlorinated water for 15 dph. At 1, 5, 10, and 15 dph, the juveniles were anesthetized by cooling them in ice water for 10 to 15 s. Then each juvenile that showed GFP fluorescence in its germ cells was selected and the fluorescence was measured with an inverted fluorescence microscope (Eclipse TE300; Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a filter set composed

of a 460–490 nm excitation filter and a 510-nm barrier filter. Fluorescent images of the gonad were recorded with a digital camera (Coolpix950, Nikon, Tokyo, Japan). We created image of extracted green fluorescent area from each image by green red blue (RGB) processing (Adobe systems Corp., Tokyo, Japan) and then manually outlined its shape that corresponds to the gonad. Then the area of the shape was measured with an image-processing system (Luminavision, Mitani Corp., Fukui, Japan). After recording the GFP fluorescence, each specimen was dissected out its gonad with a razor under a stereoscopic microscope (SZX12, Olympus Co., Tokyo, Japan), and laid on a glass slide. Caudal fin from each specimen was then removed and was subjected to *SLI* extraction for determining genotypic sex of each individual. Then 20 μ L of trypsin solution (0.2% trypsin, 0.02% EDTA in PBS (-)) was dripped onto the gonad; 10 min later, germ cells were completely dissociated, which enabled us to count them (Fig. 2-1). Counting the germ cells from the same gonad was repeated three times for accuracy.

2.2.4. Statistical analysis

Statistical differences of germ cells number between male and females at 1, 5, 10 and 15 dph juveniles were analyzed by a two-sample t-test (parametric data) and a Mann-Whitney test (nonparametric data). Correlation between GFP-fluorescent area and germ cell number was assessed by Kendall's τ test. All statistical analyses were performed with the SPSS Base 10.0J (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

2.3. Results and Discussion

Changes in GFP-fluorescent area and number of germ cells in *olvas-GFP/STII-YI* strain are shown in Table 2-1. In XX females at 15 dph, the average fluorescent area dramatically increased approximately 10-fold and the averaged germ cell numbers increased by almost 20-fold compared with those of 1 dph XX females. In contrast to female, the average fluorescent area and the average number of germ cells in XY males were constant and did not significantly change throughout the experiment

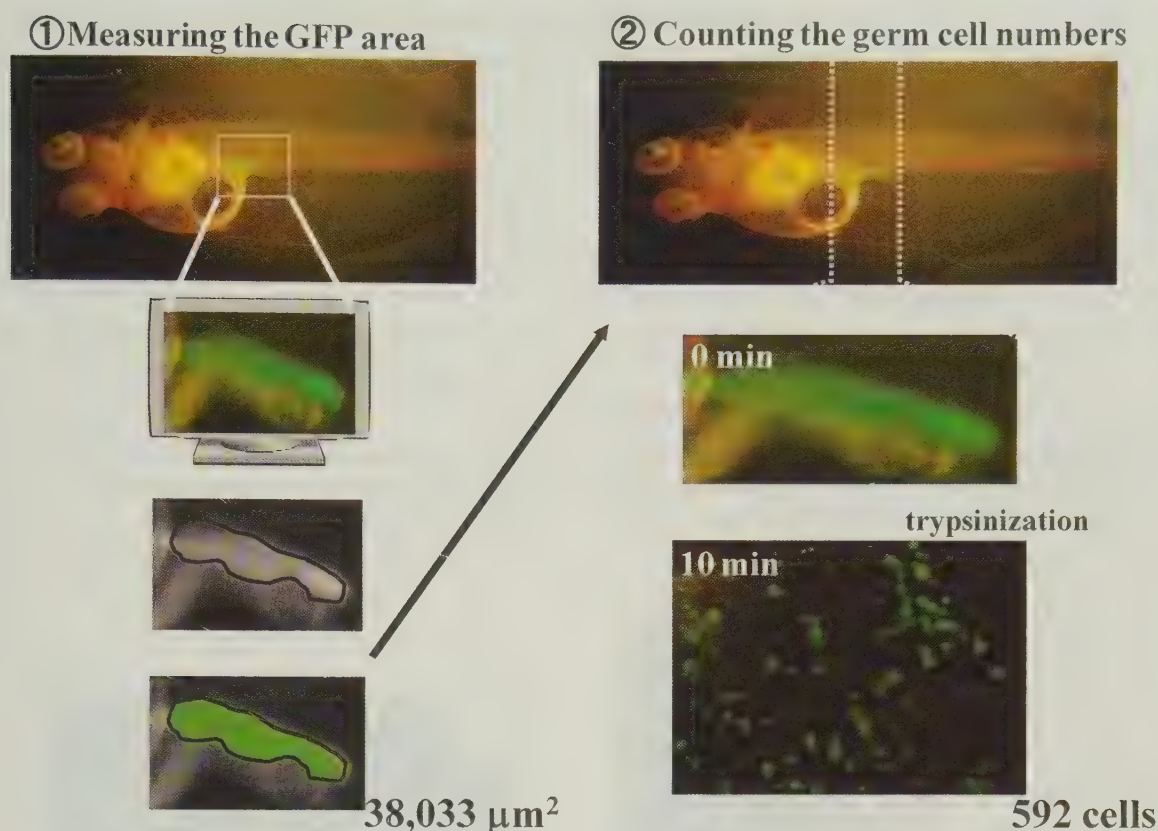


Fig. 2-1. Procedures for measuring the green fluorescent protein (GFP) area and counting the number of germ cells.

(duration, 15 dph; $p = 0.114$). Consequently, at 10 dph, the fluorescent area and germ cell number in XX females were 10-fold the values in XY males (Fig. 2-2). The GFP fluorescent area was significantly correlated with germ cell number both in XX females ($R = 0.923$, $p < 0.01$) and in XY males ($R = 0.400$, $p < 0.05$).

Visual differences in germ cell proliferation pattern between the sexes during development from untreated embryos were detected by measuring GFP fluorescence. Dimorphism of gonad differentiation between male and female in teleosts has been reported for medaka (Satoh and Egami, 1972) and tilapia (Nakamura and Takahashi, 1973). Satoh and Egami (1972) reported that the number of germ cells in female medaka was 5-fold that in males at 10 dph. Our results, obtained from counting the numbers of germ cells showing GFP fluorescence, are consistent with this report. Furthermore, we found an apparent correlation between the area of GFP fluorescence and the number of germ cells

in both genotypic sexes, that developed from both treated and untreated embryos, even in juveniles as young as 10 dph. This fact demonstrates that early effects of chemicals may be evaluated by measuring the GFP fluorescent area of gonads in this strain of medaka.

Chapter 3. Effect of 17α -ethinylestradiol on sexual differentiation in the *olvas-GFP/STII-YI* strain

3.1. Introduction

In chapter 2, a novel method was established to determine the germ cell numbers by measuring the area of green fluorescent protein (GFP) fluorescence. This finding indicated that observation of GFP-fluorescent gonad have a potential to detect the effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on the sexual differentiation in the living organisms.

In chapter 3, we exposed ethinylestradiol (EE_2) to the early-stages of *olvas-GFP/STII-YI* strain in 2

Table 2-1. Area of green fluorescent protein (GFP) fluorescence and number of GFP-positive germ cells in *olvas-GFP/STII*-YI strain at 1, 5, 10 and 15 days posthatch

Days posthatch (dph)	GFP fluorescent area (μm^2) ^a		No. GFP positive germ cells ^a	
	XY	XX	XY	XX
1	7937 $\pm$ 3479 (7)	9482 $\pm$ 4167 (7)	29 $\pm$ 9.7 (7)	42 $\pm$ 8.1 (7) * ^b
5	6455 $\pm$ 3699 (6)	23712 $\pm$ 12344 (6) ** ^b	65 $\pm$ 41 (6)	179 $\pm$ 49 (6) ** ^b
10	6377 $\pm$ 1693 (6)	58145 $\pm$ 20317 (5) ** ^b	49 $\pm$ 15 (6)	453 $\pm$ 160 (5) ** ^b
15	6973 $\pm$ 2453 (5)	101785 $\pm$ 26897 (6) ** ^b	68 $\pm$ 45 (5)	831 $\pm$ 367 (6) ** ^b

^a Numbers in parentheses indicate the number of individuals examined. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation.

^b GFP fluorescent area and germ cell numbers in XX females are significantly greater than those in XY males on the same day posthatch. * and ** denote significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

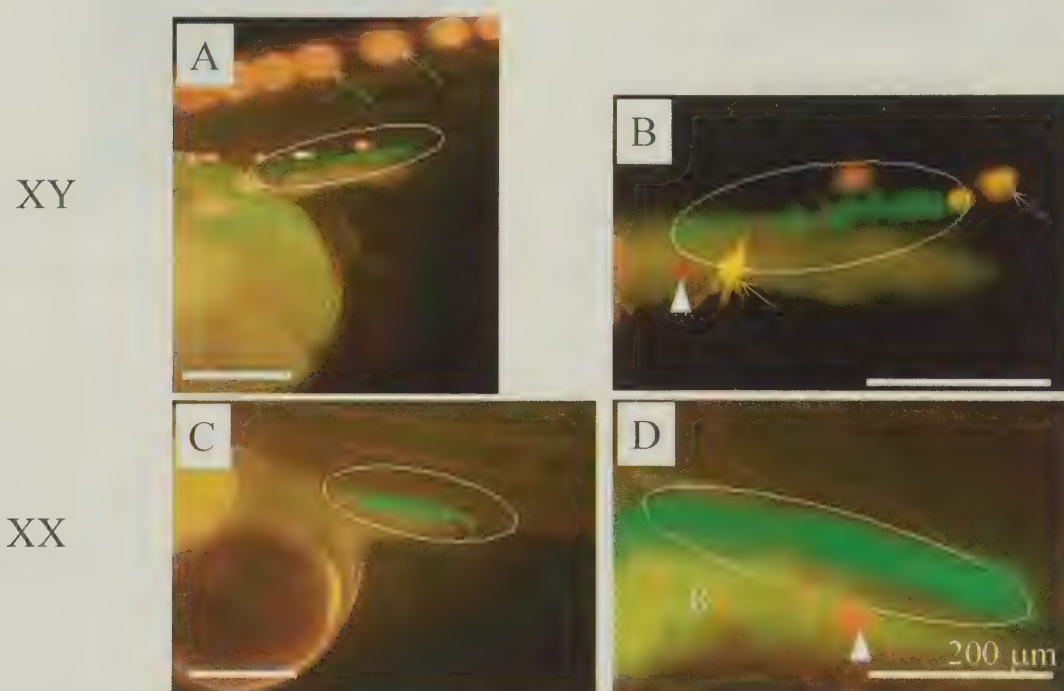


Fig. 2-2. Green fluorescent protein (GFP) fluorescent images captured from lateral side in the *olvas-GFP/STII*-YI strain of (A, B) genotypic male and (C, D) genotypic female. (A, C) 1 day posthatch and (B, D) 10 days posthatch. Outlined area in each of photo corresponds to the gonad. Arrow: leucophore, a male specific pigment. Arrowhead: autologous red fluorescence of brine shrimp. R: residual food and/or discharges in the gut. STII, see-through II.

different designs and examined the effects on germ cell proliferation and sexual differentiation. First, 1 days post-fertilization (dpf) embryos collected from parental fish were *in ovo* exposed to EE₂ with the nanoinjection technique. Second, the newly hatched fry were continuously exposed to different concentrations of waterborne EE₂ for 35 days, when

female gonadal development is complete (Yamamoto, 1963).

In ovo exposure of EE₂ was performed with nanoinjection method. Nanoinjection into the fish embryos (Walker *et al.*, 1996) has been proposed as a powerful tool for evaluating the effects of EDCs (Edmunds *et al.*, 2000; Papoulias *et al.*, 2000a, 2000b)

and crude extracts of chemical contaminated soil (Wilson and Tillitt, 1996; Ishaq *et al.*, 1999), because it allows researchers to assess the toxicity of lipophilic environmental contaminants to early life stages of fish in a manner that realistically reflects environmental exposure and simulates maternal transfer with no need to chronically expose adult fish and also allows accurate quantitation of the dose to the developing embryo including the germ cell proliferation stage (Fig. 3-1). This technique is also expected to provide a small-scale facility and experimental equipments and relatively shorter exposure duration.

Waterborne exposure to evaluate the effects of chemicals on aquatic organisms was a well established method proposed as standard *in vivo* screening testing methods in fish Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines (1999). In chapter 3, we examined the effects of EE₂ on sexual differentiation by estimating the proliferative activity of germ cells at 10 days posthatch (dph) and further investigated the chronic effects on gonadal development in the medaka (*Oryzias latipes*).

3.2. Materials and Methods

3.2.1. Nanoinjection exposure

3.2.1.1. Preparation of microneedles and nanoinjection procedure

Microneedles were prepared as based on the methods of Walker *et al.* (1996) and Papoulias *et al.* (2000a) with slight modification. Briefly, aluminosilicate capillary tubes (1.0 mm o.d. and 0.58 mm i.d; Sutter Instrument, Novato, CA, USA) were drawn to 8–10 μ m diameter with a microelectrode puller (PN-30; Narishige, Tokyo, Japan) and then were siliconized (Sigmacote; Sigma, St Louis, MO, USA) and beveled at a 30° angle with a beveler (EG-40, Narishige, Tokyo, Japan). The microneedles were loaded with chemical solution via microloading Femtotips (Eppendorf, Madison, WI, USA). The injection volume of each microneedle was adjusted to 0.5 nL (Villalobos *et al.*, 1999), which corresponds to 0.1% of medaka egg volume, and calibrated before use by measuring the diameter (approximately 100 μ m) of a droplet formed in water and controlling the injection pressure (500–1000 hPa) and/or injection duration (0.5–1.0 s)

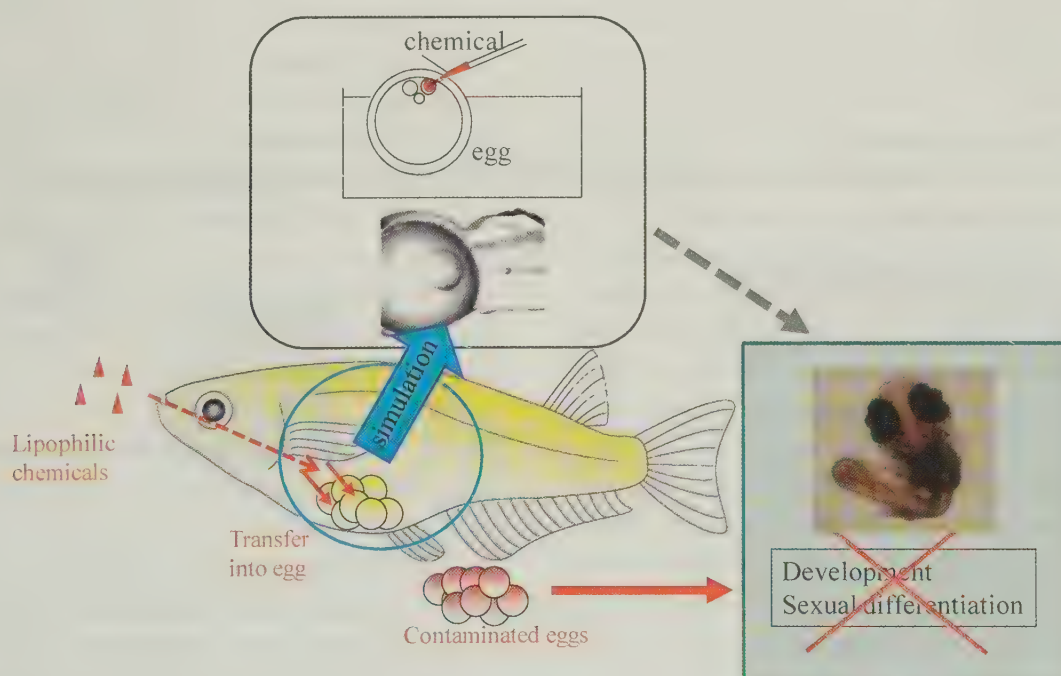


Fig. 3-1. Schematic images of maternal transfer of lipophilic chemicals into eggs and nanoinjection technique.

appropriately with the aid of a Femtojet (Eppendorf) and a micromanipulator (MN-151; Narishige). The diameter (approximately 100 μm) of oil droplet that corresponds to 0.5 nL was calculated as follows;

As medaka egg radius is approximately 0.5 mm,

$$\begin{aligned}\text{medaka egg volume} &= \frac{4}{3} \pi r^3 = \frac{4}{3} \pi (0.5 \text{ mm})^3 \\ &= 0.5236 \text{ mm}^3 = 0.5236 \mu\text{L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{injection volume} &= 0.5236 \mu\text{L} \times 0.001 \\ &- 0.52 \text{ nL} = 0.0005 \text{ mm}^3 \\ &= \frac{4}{3} \pi r^3 \\ r &= 0.049237 \text{ mm}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{diameter of a droplet} &= 2r = 0.0985 \text{ mm} \\ &= 98.5 \mu\text{m} = \text{approx. } 100 \mu\text{m}\end{aligned}$$

In this condition, variation of nanoinjection was assessed to less than 20% by measurement of tributyltin (TBT) in embryo nanoinjected with TBT (data not shown)

3.2.1.2. Test organism

The *olvas-GFP*/STII-YI strain was provided by Y. Wakamatsu, Bioscience Center, Nagoya University, Japan and was bred in our laboratory. We used a line heterozygous for *olvas-GFP* in this experiment; the ratio of GFP-positive to negative (no fluorescence) embryos was theoretically 1 to 1. Parental fish were kept under the conditions as described in chapter 2.2.1.

3.2.1.3. Embryo Nanoinjection

Embryos were collected from breeding females in the morning, and healthy embryos were selected. The embryos were sterilized and washed (chapter 2.2.3. in detail) and were embedded in 2 % agarose gel on glass slides just before nanoinjection. EE_2 in triolein was injected into 71, 159, 162 and 161 embryos (within 8 h after fertilization) in the 0.1, 0.5, 2.5 and 5.0 ng of EE_2 per egg, respectively. EE_2 was nanoinjected directly into the oil globule with the aid of a Femtojet and a micromanipulator. Embryos were also injected with EE_2 -free triolein (triolein control) or not injected (uninjected control). The treated embryos were washed and maintained in 10 mL of embryo rearing medium (chapter 2.2.3. in detail) in a 6-well multiwell plate (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) at 25–27°C until hatching.

Hatched juvenile were transferred to 2-L square glass containers (20 individuals per container) and kept in dechlorinated tap water at 25–27°C and were fed granulated freeze-dried brine shrimp (Tetra, Japan).

Mortality and abnormal development were assessed daily during the embryogenesis. Delay in embryonic development was identified by comparison of developmental stages according to Iwamatsu (2004). Hatchability, swim-up failure and time-to-hatching were also assessed in the hatching embryos. Hatched juvenile were transferred to 2-L square glass containers (20 individuals per container) and maintained in artificial seawater (salinity was adjusted at 0.1%) at 25–27°C. Hatching rate was calculated as the ratio of hatched embryos to the total number of live embryo at day 1 post-injection. Survival rate was calculated as the ratio of live embryos at 100 dph to the total number of live embryo at day 1 post-injection. They were fed granulated freeze-dried brine shrimp (Tetra, Japan) around the onset of hatching and, as they grew up, they were fed with *Artemia* nauplii (< 24 h after hatching) twice a day.

3.2.1.4. EE_2 working solution

EE_2 was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) and prepared as a stock solution by dissolving in acetone (10 mg/ml). Triolein (99.0% purity) was purchased from Wako Pure Chemical (Tokyo, Japan) and filter-sterilized before use through a 0.22 μm PTFE filter (Millipore, Bedford, USA).

The EE_2 stock solution was diluted with 1 mL of triolein, and acetone was evaporated under a stream of nitrogen at room temperature. The final concentrations of EE_2 were 0.2, 1, 5, 10 ng/nL. These EE_2 solutions were stored at 4°C under nitrogen.

3.2.1.5. Measurement and quantification of the area of GFP fluorescence at 10 dph juvenile

At 10 dph, gonad development in GFP-positive juveniles was assessed by measuring the area of GFP fluorescence and counting germ cell numbers. Identification and record of GFP fluorescent image of the gonad were performed according to the procedures in chapter 2.2.3. Caudal fin from each specimen was then removed and was subjected

to sex-linked 1 (*SLI*) extraction for determining genotypic sex of each individual. GFP-negative juveniles were continued to maintain in the artificial seawater at 25–27°C for 100 days; then their gonads were examined histologically (Fig. 3–2).

3.2.1.6. Characterization of adult fish at 100 dph

At 100 dph, the fish were anesthetized in ice water, blotted on filter paper, and measured for body weight and total length. Then, their development of secondary sex characteristics (size and shape of anal and dorsal fins, presence or absence of papillary processes on anal fin, dorsal fin notch, and female-like urogenital papillae) were assessed. Gonads were removed and weighed to calculate the gonad somatic index (GSI), fixed in Bouin’s solution, and prepared for histological observation. Finally, the caudal fin from each specimen was removed and subjected to extraction of the *SLI* marker for identification of the genotypic sex. The fixed gonads were dehydrated and embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany). Serial transverse sections (5 μm thick) were cut with a microtome. The sections were stained with hematoxylin and eosin, mounted with Eukitt (O.

Kinder, Freiburg, Germany), and examined under a light microscope. Inter sex (*testis-ova*) fish were combined into the male category.

3.2.1.7. Determination of genotypic sex

Genotypic sex in each individual at 10 dph and 100 dph was determined by the polymerase chain reaction (PCR) analysis of *SLI* according to the procedures as described in chapter 2.2.2.

3.2.2. Waterborne exposure

3.2.2.1. Test organism

Brood strain of *olvas-GFP/STII-YI* strain was maintained at Nagoya University. Healthy embryos collected from breeding females were sterilized and maintained until hatching under the described conditions in chapter 2.2.3.

3.2.2.2. Identification of GFP Fluorescence

The hatched juveniles were first anesthetized in ice water in a petri dish (60 × 15 mm; Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and GFP expression was detected in the germ cells by using a stereoscopic fluorescence microscope



Fig. 3–2. Experimental design of nanoinjection experiment using *olvas-GFP/STII-YI* strain. GFP, green fluorescent protein; STII, see-through II.

(MZFLIII; Leica, Heerbrugg, Switzerland) equipped with a GFP2 filter set composed of a 480-nm / 40-nm excitation filter and a 510-nm barrier filter.

3.2.2.3. Special reagents

EE₂ was purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) and a 100 mg/L stock solution was prepared by dissolving EE₂ in acetone. An aliquot was then evaporated to dryness under N₂ gas, diluted with deionized water, and magnetically stirred for approximately 24 h to obtain a final concentration of 1 mg/L of EE₂ in water. This aqueous solution was diluted with dechlorinated water to prepare a working EE₂ stock solution of 9 µg/L.

3.2.2.4. Exposure conditions

Normal and healthy 1 dph juveniles showing intense GFP fluorescence in their gonads were exposed to EE₂ for 35 days. The sex of each fish was tentatively determined by the presence or absence of leucophores. Each treatment consisted of three glass chambers, holding a total of 30 males (leucophore-positive) and 20 females (leucophore-free). One chamber contained the 20 females and the other two chambers contained 15 males each, because we had assumed higher mortality in males than in females according to the results reported by an earlier study (Seki *et al.*, 2002). As described by Benoit *et al.* (1982), a flow-through mini-diluter system was used to provide exposure to EE₂ in two phases, namely, 0 (control), 25, 50, 100, and 200 ng/L in the first phase, and 0 (control), 400, 800, and 1600 ng/L in the second phase. The EE₂ stock solution was delivered by a mini-chemical pump (TOKYO RIKAKIKAI, Tokyo, Japan) and diluted with dechlorinated tap water. Flow rates of the stock solution and dilution water were checked daily. The 1.8-L of test solution in each chamber (235 × 110 × 70 mm) was replaced nine times per day whereas the stock solution was changed every 2 days. Fish were maintained under 14:10-h light: dark photoperiod and fed granulated freeze-dried brine shrimp (Tetra, Japan) until 10 dph from hatch and *Artemia* nauplii ad libitum from 11 dph to 35 dph twice daily. Residual food and feces were carefully removed each day; hardness, pH, and temperature of test solutions were monitored periodically.

Throughout the experimental period, hardness in the water was 20–30 mg CaCO₃/L and pH was 6.7–7.0. Water temperature remained at 24 ± 1°C. The fish were observed daily to assess mortality and appearance.

EE₂ concentrations were measured four times (every 7–8 days). The means (coefficients of variation) of measured EE₂ concentrations in each of the test solutions during the exposure period were 25.2 (15.8), 45.1 (6.1), 80.1 (7.4), 158 (22.4), 447 (28.8), 880 (18.3) and 1710 (11.4) ng/L. The EE₂ concentration in the control treatment was less than the detection limit (2.0 ng/L) in all analyses.

3.2.2.5. Measurement and quantification of the GFP fluorescent area at 10 dph juvenile

At 10 dph, 10 leucophore-positive males and 10 leucophore-free females were randomly selected from each treatment group, anesthetized on ice, and the GFP fluorescence in their gonads was visualized. Fluorescent images were then recorded by a color, digital, cooled, charge-coupled camera (C4742-95; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) mounted on the microscope, and analyzed using IPLab Spectrum 3.5 software (Scanalytics, Fairfax, VA). After recording the GFP fluorescence intensity in their gonads, the medaka were returned to their glass chambers to resume their continuous exposure to EE₂. The area of GFP fluorescence in each specimen was determined by an image-processing system (Scion image 4.0.2, Scion Corporation, Washington, D.C., USA).

3.2.2.6. Characterization of fish at 35 dph

At 35 dph, exposure to EE₂ was terminated and each medaka was anesthetized on ice. Their fluorescent images were captured from the right side of the fish to reduce measurement errors (Wakamatsu *et al.*, 2001) and the images were compared with the histological results. The medaka were blotted on filter paper, their body weights and total lengths were measured, and parts of their caudal fins were excised with a razor for *SLI* identification. Ten XY and 10 XX specimens were randomly selected from each treatment group on the basis of *SLI* identification and subsequently subjected to histological examination. To compensate

for the higher mortality due to higher EE₂ concentrations in the 880 and 1710 ng/L groups, gonads were obtained from 13 individuals (nine XY and four XX individuals from the 880 ng/L group, and eight XY and five XX individuals from the 1710 ng/L group; Table 3-3). The entire bodies of the medaka were fixed in Bouin's solution, followed by dehydration and embedding in paraffin wax. Serial longitudinal sections 5 μ m in thickness were obtained and stained with hematoxylin and eosin before being mounted with Eukitt and examined under a light microscope. Gonad histology was categorized as normal testis, testis-ova in XY fish, and ovary in XX fish and undifferentiated in XY and XX fish. The results of the histological examination were used to determine the sex phenotype of each specimen.

3.2.2.7. Determination of EE₂ concentration in the test solution

The concentrations of EE₂ in the test solutions were measured periodically during the entire exposure period. Aliquots of 250 ml of the test solution were taken from all chambers of each treatment group and pooled. After adding 30 ng of ¹³C₂D₂-ethynylestradiol in methanol as an internal standard (IS), each pooled water sample was passed through a Sep-Pak PS2 solid-phase extraction cartridge column (Waters, Tokyo, Japan) pre-washed with 10 ml of methanol and 20 ml of purified water. Finally, the Sep-Pak PS2 column was washed with 20 ml of purified water and the captured EE₂ was eluted with 3 ml of methanol. This eluate was then concentrated to approximately 0.3 ml under a stream of nitrogen at 40°C, after which the sample was analyzed by using a high-performance liquid chromatography (Shimadzu LC-10AD, Tokyo, Japan) equipped with an Inertsil ODS-3V column (length, 250 mm; inner diameter, 4.0 mm; particle size, 5 μ m; GL Sciences, Tokyo, Japan) at 40°C. Each 20- μ l sample was injected into the chromatograph and eluted in the mobile phase. Gradient programs were performed by using mobile phase gradients of A/B = 20/80 to A/B = 0/100 over seven minutes (A: 100% acetonitrile; B: methanol in water) at a flow rate of 1.0 ml/min. After elution, the sample was analyzed with a mass spectrometer (JEOL LC Mate,

Tokyo, Japan) which yielded target ion values (*m/z*) for EE₂ and IS of 295 and 299, respectively.

3.2.2.8. Determination of genotypic sex

Identification of genotypic sex of each specimen at 35 dph was performed with PCR analysis of *SLI* according to the procedures described in chapter 2.2.2.

3.2.3. Statistical analysis

In the nanoinjection experiment, to detect statistical differences, other than differences in mortality, between uninjected and triolein controls, a two-sample t-test (parametric data) and a Mann-Whitney test (nonparametric data) were performed. When no difference was found between the triolein control and uninjected groups, these groups were pooled as a control for subsequent analysis. Correlation between GFP-fluorescent area and germ cell number was assessed by Kendall's τ test. To compare the GSI among all treatment groups, gonad weight was log-transformed and then analyzed by analysis of covariance (ANCOVA), using the body weight of individuals as the covariate.

In both nanoinjection and waterborne experiment, the experimental data including growth (total length and body weight) and area of GFP fluorescence were checked for homogeneity of variances and assumptions of normality across treatments by Levene's test. When the assumptions were met, the data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. When the data failed to meet the assumptions, a Kruskal-Wallis test was used, followed by a Mann-Whitney test with Bonferroni's adjustment. A chi-square test was used to assess the difference in mortality. All statistical analyses, except for ANCOVA, were performed with the SPSS Base 10.0J (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). ANCOVA was performed with the SPSS Advanced Model 11.0J (SPSS). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3.3. Results

3.3.1. Nanoinjection exposure

3.3.1.1. Survival and growth after treatment with EE₂

Fig. 3-3 shows the toxicity of EE₂ nanoinjected into embryos until the day of hatching. The majority of embryos were dead on the next day of injection, indicating the lethal toxicity of EE₂. Survival rates

at 100 dph of fish further decreased to approx. 30% in the EE₂ treatment groups (Table 3-1). However, no effect of EE₂ on total length or body weight was observed among surviving adults (100 dph) from all treatments (Table 3-2).

3.3.1.2. Effect of in ovo exposure of EE₂ on germ cell proliferation at 10 dph
Deleterious effects of EE₂ on proliferation of germ



Fig. 3-3. Cumulative mortality from nanoinjection (day 0) through to day 11 post-injection (around the day of hatching) in medaka juveniles that developed from embryos injected with 0.1–5.0 ng/egg of 17 α -ethinylestradiol (EE₂). ** denotes significantly different from pooled control groups at $p < 0.01$.

Table 3-1. Survival, phenotypic sex and gonadal histology of adult medaka (100 days posthatch) injected *in ovo* with 17 α -ethinylestradiol (EE₂)

Dose (ng/egg)	Total No. of embryos injected (0 days post-fertilization)	Survival to adult (%) (100 dph)	Total No. of fish observed	Gonad Histology			
				Genotypic male ^{a,b}		Genotypic female ^{a,b}	
				Phenotypic male	Phenotypic female	Phenotypic male	Phenotypic female
Uninjected	158	44.2	42	25 (60)	0	0	17 (40)
Triolein	152	44.9	44	25 (57)	0	0	19 (43)
0.1	71	28.1	9	5 (56)	0	0	4 (44)
0.5	159	28.8	23	11 (48)	2 (9)	0	10 (43)
2.5	162	32.8	23	8 (35) ^c	2 (9)	0	13 (56)
5.0	161	27.9	19	4 (21)	7 (37)	0	8 (42)

^a Numbers in parenthesis indicate the relative proportion (in %) of the phenotypes to genetic males and females.
^b Genotypic sex of each individual was determined by amplification of the sex-linked 1 (*SLI*) gene by polymerase chain reaction (PCR).
^c One fish with *testis ova* were observed.

Table 3-2. Morphological characteristics of adult medaka (100 days posthatch) injected *in ovo* with 17 α -ethinylestradiol (EE₂)

Dose (ng/egg)	XY male			XY female		XX female	
	Total length ^{a,b} (mm)	Body weight ^{a,b} (mg)	No. Papillary Processes ^{a,b}	Total length ^{a,b} (mm)	Body weight ^{a,b} (mg)	Total length ^{a,b} (mm)	Body weight ^{a,b} (mg)
Uninjected	35.1 $\pm$ 2.0 (25)	443 $\pm$ 93	99 $\pm$ 25			36.3 $\pm$ 2.9 (17)	515 $\pm$ 101
Triolein	35.2 $\pm$ 1.9 (25)	380 $\pm$ 65	74 $\pm$ 41			36.0 $\pm$ 1.8 (19)	537 $\pm$ 87
0.1	33.6 $\pm$ 2.0 (5)	347 $\pm$ 48	91 $\pm$ 11			34.3 $\pm$ 0.8 (4)	392 $\pm$ 74
0.5	34.0 $\pm$ 1.8 (11)	434 $\pm$ 100	90 $\pm$ 18	32.6 (2)	358	35.8 $\pm$ 4.4 (10)	580 $\pm$ 263
2.5	36.2 $\pm$ 1.7 (8)	458 $\pm$ 90	84 $\pm$ 21	39.9 (2)	672	35.9 $\pm$ 2.8 (13)	517 $\pm$ 148
5.0	34.8 $\pm$ 2.8 (4)	446 $\pm$ 124	99 $\pm$ 18	38.7 $\pm$ 1.8 (7)	682 $\pm$ 195	36.9 $\pm$ 3.1 (7)	611 $\pm$ 70

^a Numbers in parentheses indicate the number of individuals examined. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation
^b No significant differences from pooled control groups at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

cells were detected as early as 10 dph (Fig. 3-4 and 5). In the uninjected and triolein treatment groups, sexual dimorphism of the gonad between sexes was evident (Fig. 3-4 A and C). The area of GFP florescence and the number of germ cells in XX females that developed from embryos treated with 5.0 ng EE₂/egg were only 40.9% and 53.1% of pooled control values, and the response was dose dependent ($p = 0.048$) (Fig. 3-4 D and 5). In XY males, 1 out of 7, 2 out of 7, and 1 out of 3 males that developed from embryos injected with 0.5, 2.5, and 5.0 ng EE₂/egg had a large fluorescent area ($> 15\,000\,\mu\text{m}_2$), accompanied by increased numbers of germ cells (> 180 cells) (Fig. 3-4B and 5); however, considering the data from all genotypic males, no significant difference was observed among treatment groups.

Comparison of males with females in each treatment group at 10 dph (Fig. 3-5) shows that the difference in fluorescent area and number of germ cells between males and females decreased with increasing concentration of EE₂. The area of GFP fluorescence significantly differed between sexes for the pooled control group and for fish that developed from embryos treated with 0.1, 0.5 ($p < 0.01$), and 2.5 ng EE₂/egg ($p < 0.05$), but not significantly for the 5.0 ng EE₂/egg treatment ($p = 0.0924$). The number of germ cells significantly differed between sexes for the pooled control group and for fish that developed from eggs treated with 0.1 and 0.5 ng EE₂/egg

($p < 0.01$), but not significantly for treatments with < 2.5 ng/egg ($p = 0.0649$). Significant relationships between fluorescent area and germ cell number were also observed in EE₂-treated XX females ($R = 0.632$, $p < 0.01$) and EE₂-treated XY males ($R = 0.747$, $p < 0.01$) at 10 dph (Fig. 3-6).

3.3.1.3. Effect of EE₂ on sexual differentiation at 100 dph

Complete male-to-female phenotypic sex reversal occurred in genotypic male fish at 100 dph that developed from eggs injected with 0.5, 2.5, and 5.0 ng EE₂ (Table 3-1). In all fish examined, the sexual phenotype determined by examining the external secondary sex characteristics matched the sexual phenotype determined by gonad histology. XY males in all treatments had male-specific characters such as papillary processes on the anal fin. The number of papillary processes in XY males did not differ among treatments (data not shown). In contrast, sex-reversed XY females could be determined by the absence of papillary processes on the anal fin and dorsal fin notch or the presence of urogenital papillae.

Histological examination showed that both XY females and XX females had ovaries that actively produced maturing oocytes at post-vitellogenic phase. The GSI was the same in XY females and XX females, but was significantly lower in XY males

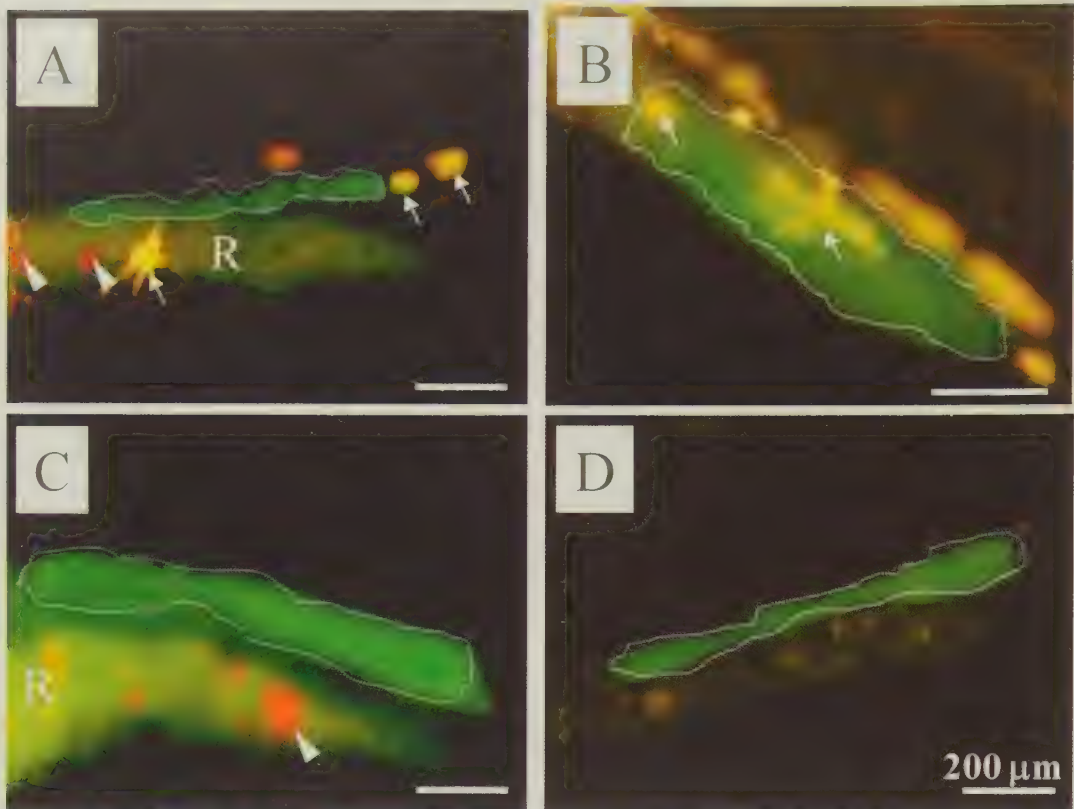


Fig. 3-4. Green fluorescent protein (GFP) fluorescent images captured from the lateral side of XY (A, B) and XX (C, D) juveniles at 10 days posthatch. (A) uninjected XY juvenile, (B) XY juvenile injected with 0.5 ng of 17 α -ethinylestradiol (EE₂), (C) uninjected XX juvenile and (D) XX juvenile injected with 5.0 ng EE₂. Outlined area in each of photo corresponds to the undifferentiated gonad. Arrow: leucophore, a male specific pigment. Arrowhead: autologous red fluorescence of brine shrimp. R: residual food and/or discharges in the gut.

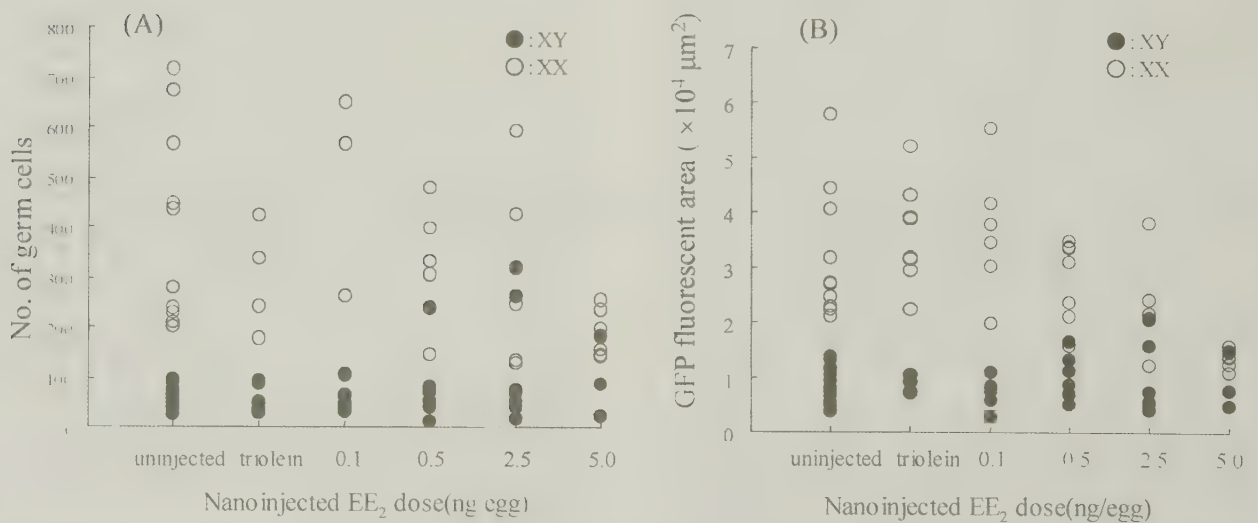


Fig. 3-5. (A) Number of germ cells and (B) area of green fluorescent protein (GFP) fluorescence plotted for individual fish at 10 days posthatch injected with the indicated amounts of 17 α -ethinylestradiol (EE₂).

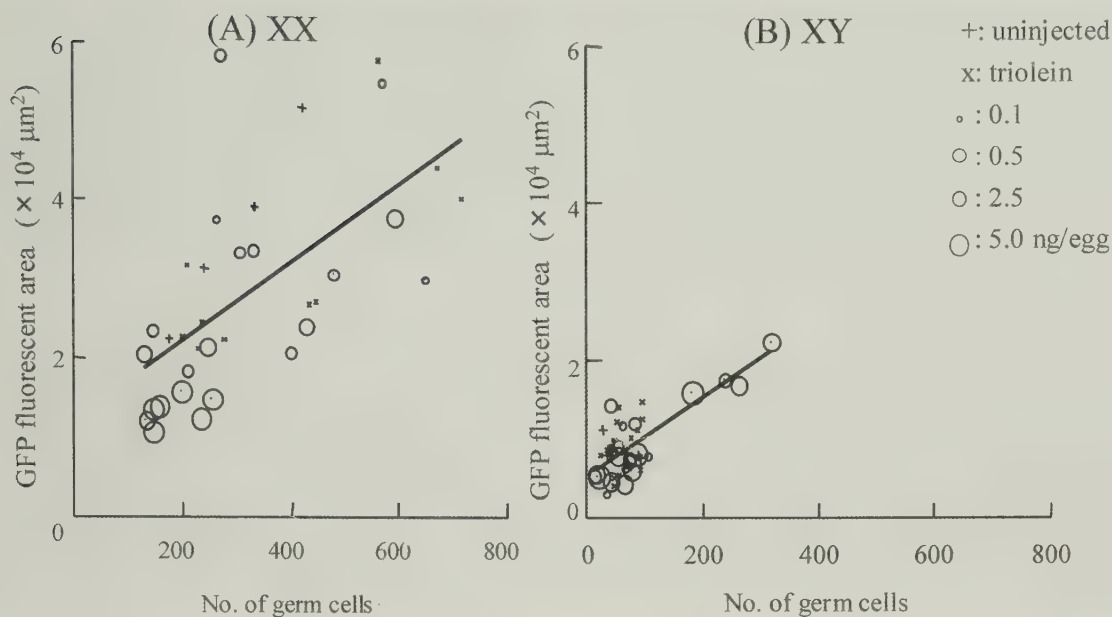


Fig. 3-6. Correlation between green fluorescent protein (GFP) fluorescent area and number of germ cells in (A) XX females and (B) XY males at 10 days posthatch for all treatment groups. Significant relationships between them were observed in XX females ($R=0.632$, $p<0.01$) and XY males ($R=0.747$, $p<0.01$).

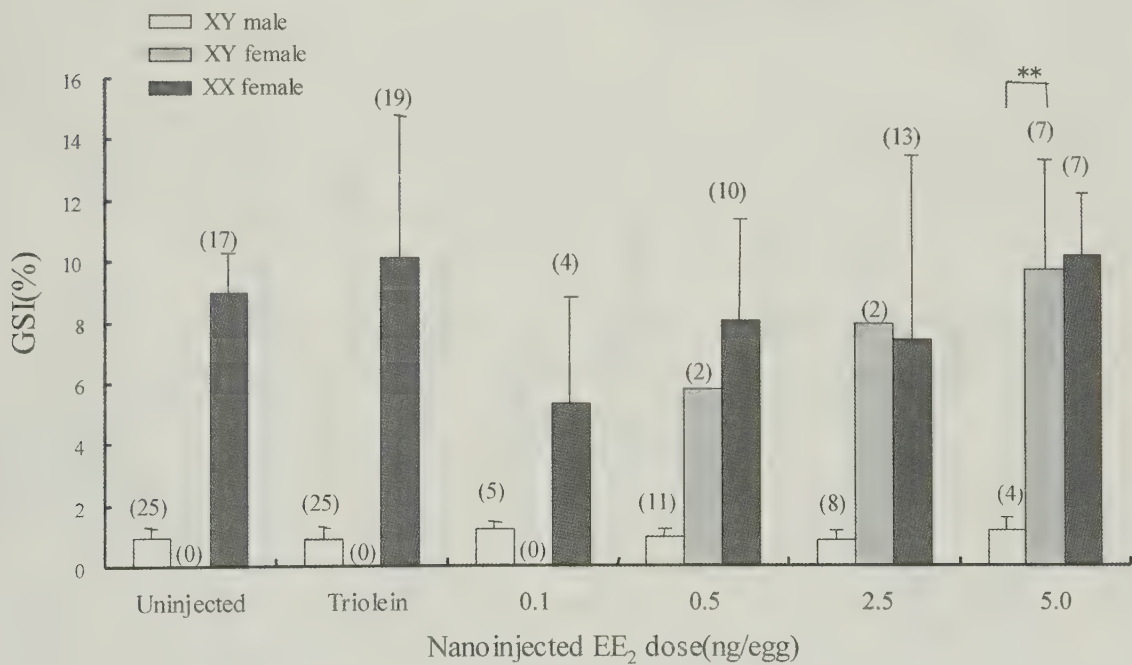


Fig. 3-7. Gonad somatic index (GSI) for XY males, XY females and XX females (mean $\pm$ standard deviation) at 100 days posthatch adult exposed *in ovo* to 17 α -ethinylestradiol (EE₂). Numbers above the bars indicate the number of individuals examined. ** denotes significant difference between XY males and XY females ($p<0.01$).

(Fig. 3-7). XY males, treated at EE₂ concentrations in which sex reversal was induced in some individuals, had normal GSI values, and no difference in GSI was observed between them and the pooled control groups.

3.3.2. Waterborne exposure

3.3.2.1. Survival and growth after treatment with EE₂

Fig. 3-8 shows the effect of EE₂ on the survival of the medaka during the exposure period. Mortality in the 880 and 1710 ng/L groups began to increase

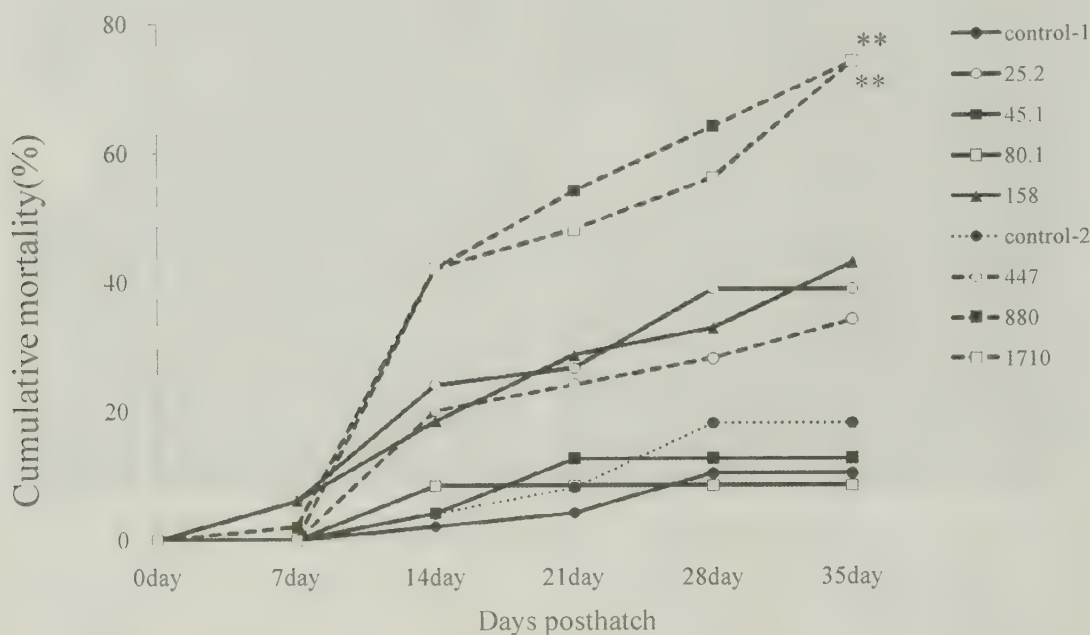


Fig. 3-8. Cumulative mortality from hatch to 35 days posthatch in each 17 α -ethinylestradiol (EE₂) treatment group (25.2-1710 ng/L). Concentrations in the figure are expressed as mean measured concentrations (ng/L). **denotes significantly different from that of the control-2 ($p < 0.01$).

Table 3-3. Total length, body weight and gonad histology of medaka at 35 days posthatch exposed to 17 α -ethinylestradiol (EE₂)

EE ₂ concn. (ng/L) ^a	Genotypic male						Genotypic female			
	Total length ^b (mm)	Body weight ^b (mg)	Gonad histology ^c				Total length ^b (mm)	Body weight ^b (mg)	Gonad histology ^c	
			Number of fish with						Number of fish with	
			Testis	Testis-ova	Ovary	Indifferent			Ovary	Indifferent
1st experiment										
Control-1	19.5 ± 2.5 (28)	65.4 ± 23.6	10	0	0	0	18.2 ± 2.3 (18)	52.7 ± 18.2	10	0
25.2	19.7 ± 2.8 (18)	69.4 ± 29.1	2	8	0	0	21.4 ± 2.6 (12)*	96.1 ± 33.2*	10	0
45.1	20.3 ± 3.0 (24)	76.5 ± 34.2	0	9	1	0	17.9 ± 3.9 (18)	55.7 ± 45.5	10	0
80.1	20.5 ± 2.4 (27)	77.3 ± 33.0	0	4	5	1	18.7 ± 2.9 (17)	60.0 ± 26.7	10	0
158	20.7 ± 2.0 (18)	80.8 ± 22.5	0	3	7	0	18.6 ± 4.4 (10)	66.1 ± 42.7	10	0
2nd experiment										
Control-2	17.8 ± 3.2 (28)	55.8 ± 26.5	10	0	0	0	16.5 ± 2.8 (13)	45.9 ± 22.7	10	0
447	13.5 ± 2.7 (23)**	30.8 ± 18.9**	0	0	4	6	12.4 ± 2.2 (10)**	17.6 ± 9.1**	9	1
880	12.5 ± 2.3 (9)**	18.1 ± 10.8**	0	0	0	9	11.2 ± 2.4 (4)**	11.8 ± 8.4**	3	1
1710	11.6 ± 0.8 (8)**	13.0 ± 5.4**	0	0	0	8	10.8 ± 0.8 (5)**	9.0 ± 2.2**	2	3

^a Mean measured concentration during the exposure period.

^b Numbers in parenthesis denote number of fish examined. Data expressed as mean $\pm$ standard deviation.

^c 20 specimens (10 XY and 10XX) were prepared for gonad histology except for 880 and 1710 ng/L treatments.

*and** denote significantly different from control at $p = 0.05$ and $p = 0.01$, respectively.

from the 7th day after the initiation of exposure, with cumulative mortality in these groups found to be significantly higher than that of the control at 35 dph ($p<0.01$) (Fig. 3-8). Dying EE₂-treated fish exhibited lightened body color and lay at the bottom of the chambers, with little or no swimming.

No significant differences were observed in either mean total length or body weight of the medaka at 35 dph in the 45.1, 80.1, or 158 ng/L EE₂ treatment groups (Table 3-3). Growth promotion at 25.2 ng/L in XX female was due to low stock density of test fish because of accidental mortality that was associated with unrelated EE₂ effects. Exposure to ≥ 447 ng/L EE₂ was seen to result in a marked decrease in growth in both XY and XX fish in comparison to the control (Table 3-3). No obvious difference in growth parameters was detected between XY and XX fish in respective treatment.

3.3.2.2. Effect of EE₂ on germ cell proliferation at 10 dph

Deleterious effects on germ cell proliferation were detected for EE₂ as early as 10 dph (Fig. 3-9 and 10). In males receiving 158 ng/L EE₂, the area of GFP fluorescence showed an increase and was significantly different from that of the control ($p<0.01$). On the other hand, the GFP-fluorescent area was seen to gradually decrease in the ≥ 447 ng/L treatment group, and this fluorescent area was significantly different in the ≥ 880 ng/L group when compared to the GFP fluorescence in the control fish ($p = 0.001$ at 880ng/L and $p=0.009$ at 1710ng/L, respectively). In females whose sex genotype had been determined by the absence of leucophores, the area of GFP fluorescence was seen to be significantly decreased in the ≥ 880 ng/L treatment groups ($p=0.002$ at both 880ng/L and 1710ng/L, respectively). The area of GFP fluorescence between XY and XX fish significantly differed in respective

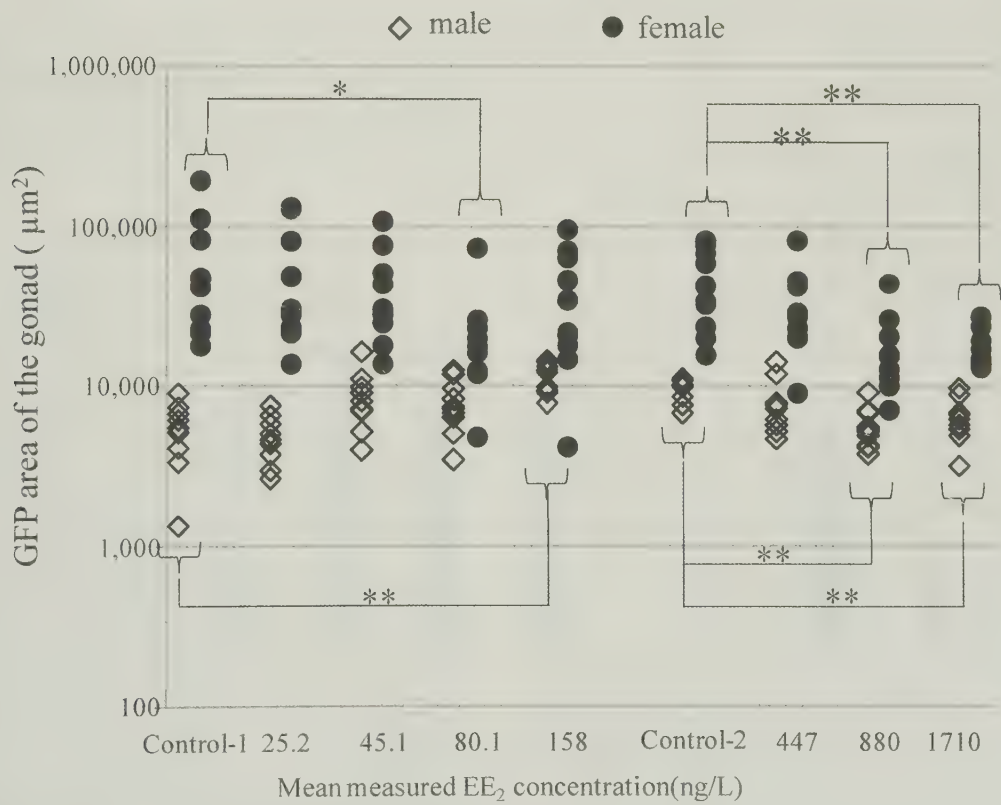


Fig. 3-9. Green fluorescent protein (GFP) fluorescent area plotted for individual fish at 10 days posthatch exposed to 17 α -ethinylestradiol (EE₂). Genotypic sex of each individual was determined by presence (male) or absence (female) of leucophore in the skin, a male specific pigment. *and ** denote significantly different from control at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

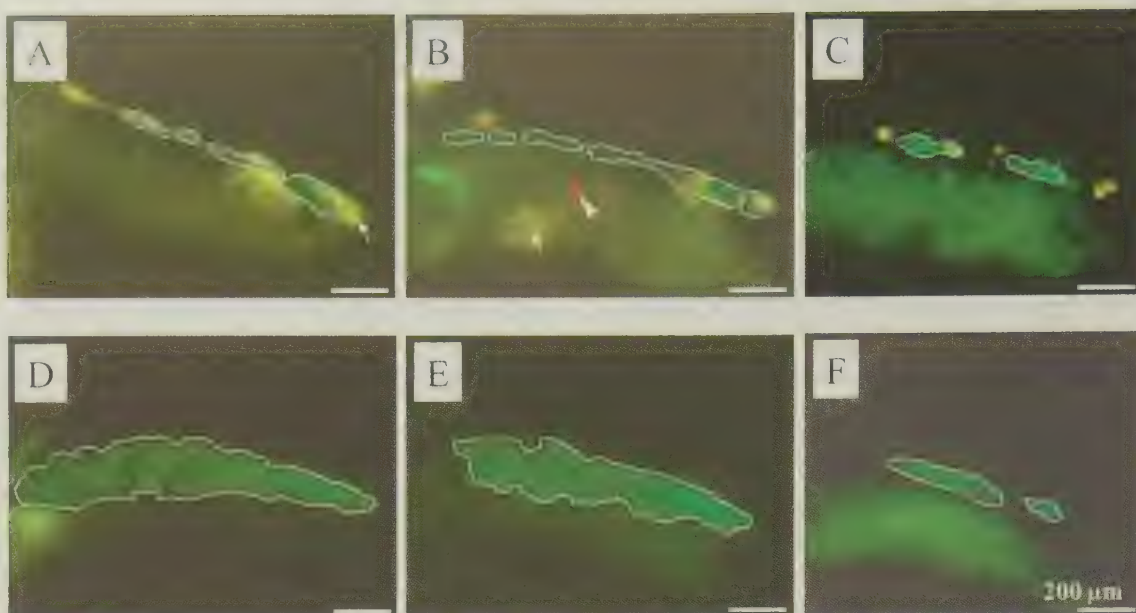


Fig. 3-10. Green fluorescent protein (GFP) fluorescent images captured from the lateral side of leucophore-positive male (A-C) and leucophore-negative female (D-F) at 10 days posthatch juvenile. Males exposed to (A) 0 ng/L (control), (B) 158 ng/L of 17 α -ethinylestradiol (EE₂) and (C) 880 ng/L. Females exposed to (D) control, (E) 158 ng/L of EE₂ and (F) 1710 ng/L. Outlined area in each photo corresponds to the undifferentiated gonad. Arrow: leucophore, a male specific pigment. Arrowhead: autologous red fluorescence of brine shrimp.

treatment ($p < 0.05$).

3.3.2.3. Histological examination and GFP fluorescent area of the gonad at 35 dph

The results of histological examination of XY fish at 35 dph revealed that the induction of testis-ova was observed in the medaka receiving ≤ 158 ng/L EE₂ (Table 3-3 and Fig. 3-11). In intersex gonads, spermatocytes and spermatids could still be identified but the incidence of previtellogenic oocytes in the testes was terrified with increasing concentrations of EE₂. Ovaries were observed in XY fish at frequencies of 1 out of 10, 5 out of 10, 7 out of 10, and 4 out of 10 in the 45.1, 80.1, 158, and 447 ng/L treatment groups respectively (Table 3-3 and Fig. 3-11E). The ovaries of sex-reversed XY females, although they were immature, were occupied with many previtellogenic oocytes and indistinguishable from that of XX control females (Fig. 3-11E). In XX fish, no obvious differences were observed between control and EE₂-exposed ovary at ≤ 158 ng/L. In contrast, XY and XX fish that had been exposed to ≥ 447 ng/L EE₂ and one XY fish from the 80.1 ng/L treatment group were seen to

have indifferent gonads that were mostly composed of small numbers of germ cells showing no evidence of spermatogenesis or oogenesis (Table 3-3 and Fig. 3-11F).

Fig. 3-12 and 13 show the histology of the GFP-fluorescent area of the gonads in XY and XX *olvas-GFP/STII-YI* strain, respectively. No significant differences were detected in the areas of GFP fluorescence in control testes and control ovaries (Fig. 3-12 and 13) or in those of the testes and ovaries of sex-reversed XY fish exposed to ≤ 447 ng/L EE₂ (Fig. 3-11AB and 12). The exception to this last observation was the significant decrease in the GFP area of the intersex gonads in XY fish exposed to 45.1 ng/L EE₂ ($p = 0.014$) compared with that of XY control (Fig. 3-12). In the fish exposed to ≥ 447 ng/L EE₂, GFP-area was also seen to have decreased to only 3 to 25% of the control GFP area, in addition to having weak fluorescence intensity, resulting in a significant difference when compared with the controls (Fig. 3-11C, 12 and 13).

3.4. Discussion

EE₂ is known to exert strong estrogenic activity

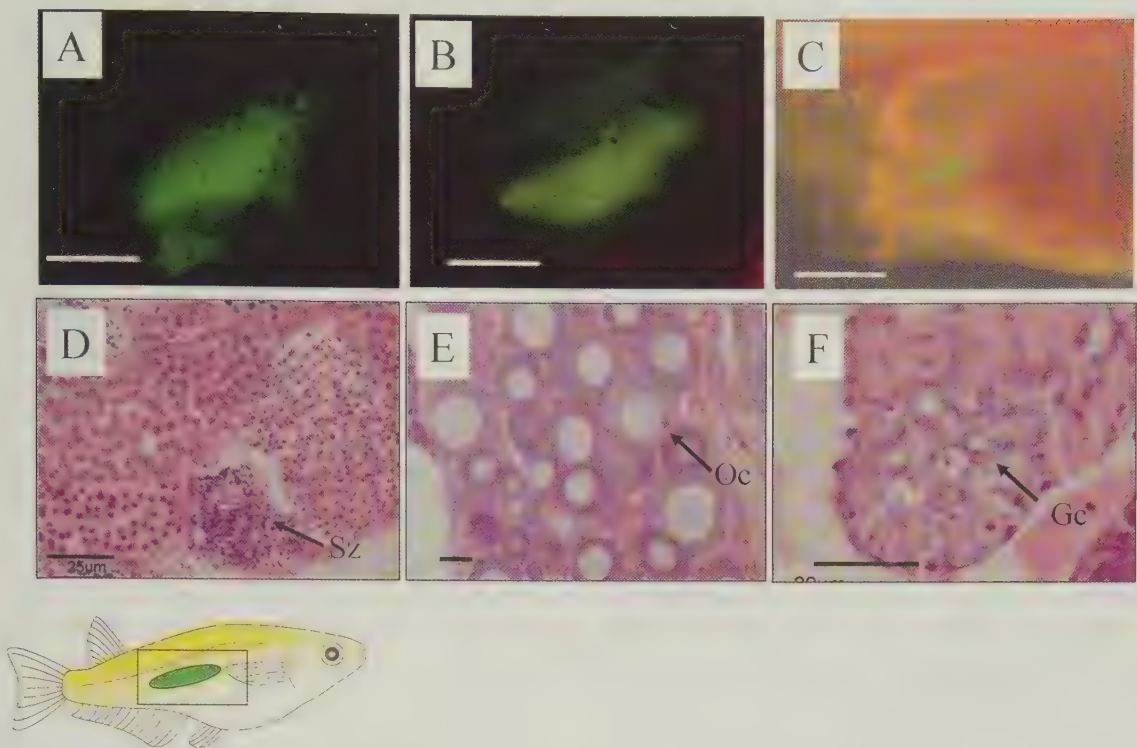


Fig. 3-11. Green fluorescent protein (GFP) images from the right lateral aspect of the XY fish (A-C) and transverse sections of XY fish at the end of 17 α -ethinylestradiol (EE₂) exposure at 35 days posthatch stained with hematoxylin and eosin (D-E). (A) GFP image of 0 ng/L (control) XY male, (B) sex-reversed XY female exposed to 94.8 ng/L of EE₂ and (C) XY fish exposed to 880 ng/L of EE₂. Histological section of testis of (D) control male, (E) sex-reversed ovary of a male exposed to 94.8 ng/L of EE₂ and (F) unidentified gonad exposed to 880 ng/L of EE₂. Gc, germ cells; Oc, oocytes; Sz, spermatozoa. Bar = 1.0 mm (A-C) and 25 μ m (D-F).

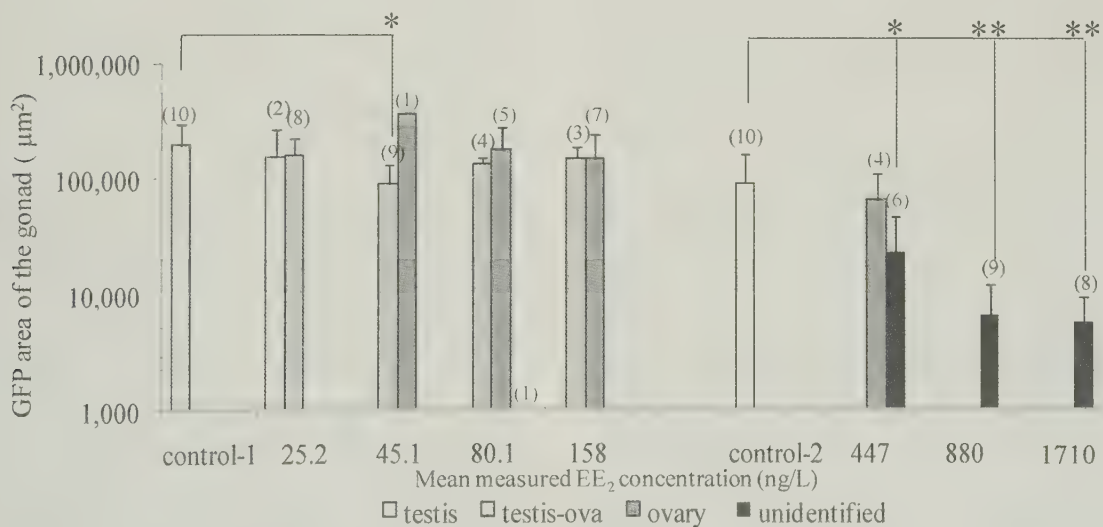


Fig. 3-12. Green fluorescent protein (GFP) fluorescent area of the XY fish at 35 days posthatch exposed to 17 α -ethinylestradiol (EE₂) categorized by the gonad histology. Error bar represents standard deviation of the mean. Numbers in parenthesis denote number of fish examined. One specimen possessing indifferent gonad in the 80.1ng /L could not be determined its GFP-fluorescent area because of weak fluorescence intensity. *and ** denote significantly different from control at p <0.05 and p <0.01, respectively.

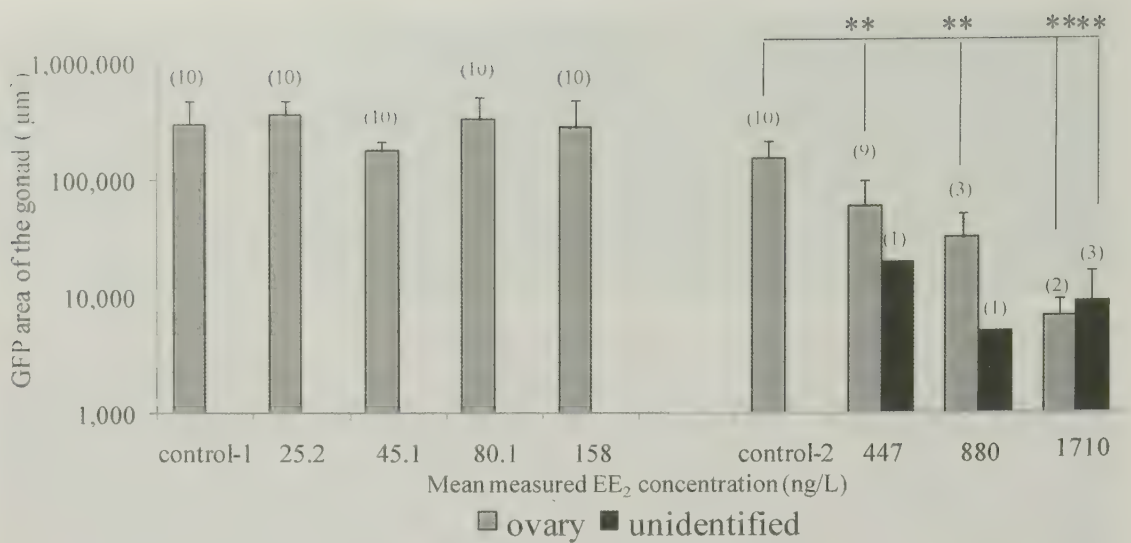


Fig. 3-13. Green fluorescent protein (GFP) fluorescent area of the XX fish at 35 days posthatch exposed to 17α-ethinylestradiol (EE₂) categorized by the gonad histology. Error bar represents standard deviation of the mean. Numbers in parenthesis denote number of fish examined. ** denotes significantly different from control at $p<0.01$.

and also to be lethal to fish (Folmar *et al.*, 2002). EE₂ was observed to cause pathological abnormalities such as lightened body color and increased immobility, finally leading to increased mortality at EE₂ exposures of ≥ 880 ng/L. Growth (total length and body length) inhibition was also observed at aqueous EE₂ exposure of ≥ 447 ng/L in both sexes. Identification of *SLI* and leucophore marker from each individual have indicated that no significant differences could be found in these parameters in medaka of XY and XX genotypes in any of the treatment groups. Weber *et al.* (2004) reported that chronic exposure of medaka (ranging from the newly hatched to the adult fish) to 10 ng/L of EE₂ resulted in toxicity in the form of increased interstitial cell death in head kidneys. This sex-specific toxicity was manifested as severely adverse effects on hematopoiesis in growing medaka, especially in the male medaka. Thus, the findings of the study by Weber *et al.* (2004) indicated that sex-specific effects of EE₂ can be seen at concentrations lower than that causing lethal toxicity.

Identification of *SLI* marker facilitates the confirmation of genotypic sex of each individual at any stages of development, including juveniles or adults. This made more efficient to detect abnormal sexual differentiation caused by EE₂. For example, in nanoinjection experiment, it is demonstrated that

abnormal sexual differentiation could be detected as early as 10 dph juvenile because lowest observable effective dose (LOED; 0.5 ng/egg) for inducing abnormal gonadal development in genotypic male at 10 dph was the same as that for inducing sex reversal in 100 dph adult fish.

To detect abnormal changes in sexual differentiation, we focused on the different male and female proliferation patterns of germ cells that occur near the onset of gonadal differentiation. In the present study, the average GFP area in control XX female medaka was about 10 times larger than that of control XY males, indicating that sexual dimorphism was significantly evident at 10 dph. Aqueous exposure to 158 ng/L EE₂ was found to abnormally enhance germ cell proliferation in males at 10 dph. The average GFP area seen in males with 158 ng/L EE₂ treatment was 11376 μm^2 , which corresponded to 137 germ cells calculated using a correlation equation between GFP area and germ cell numbers (Table 2-1); this was about twice the number seen in control XY males. Sex-based differences in germ cell numbers depend on the expression of *DMY* (*Doublesex* and *Mab-3* domain gene on the Y chromosome), which has been identified as a prime candidate for the sex-determining gene located on the Y chromosome in medaka (Matsuda *et al.*, 2007) and which functions

as an inhibitory regulator in germ cell proliferation in normal XY fish (Paul *et al.*, 2006). Paul *et al.* (2006) observed the meiotic activity of germ cells through the expression of the synaptonemal complex protein 3 (Scp3) in E_2 (17 β -estradiol)-exposed medaka at 1 dph. They had demonstrated that E_2 might mitigate the action of *DMY* to get rid of the blockade on germ cell proliferation and thus reverse the phenotypic sex of the XY medaka. To investigate how EE_2 induces abnormal germ cell proliferation in XY medaka, analysis of functional *DMY* protein should provide further insights into the mechanisms responsible for estrogen's effects.

It is noteworthy that the increase in germ cell proliferation by EE_2 in XY males at 10 dph after aqueous exposure and after direct nanoinjection was seen in a different manner. The present study showed that aqueous exposure of medaka juveniles to 158 ng/L of EE_2 enhanced germ cell proliferation to levels that were twice those seen in control males, although they were still only about 25% of the values in the control females. In contrast, nanoinjection of ≥ 0.5 ng EE_2 into the medaka embryos further enhanced germ cell proliferation in some XY males to levels that were 60–100% of those in the control females, indicating sexual differentiation towards female characteristics. The dissimilar responses to EE_2 could be associated with the different amount of EE_2 intake at 10 dph. To further examine these effects, the bioconcentration factor (BCF) was used as an estimate of the bioaccumulation potential of EE_2 . A positive relationship has been demonstrated between the log of the octanol-water partition coefficient (K_{ow} value) and the log BCF value in fish (Geyer *et al.*, 1984). Given that a log K_{ow} value of 4.2 for EE_2 (Schweinfurth *et al.*, 1997), calculated BCF value of EE_2 is to be 741 on the basis of the following linear relationship as described by Veith *et al.* (1980): $\log BCF = 0.85 \log K_{ow} - 0.70$. An *in vivo* full life toxicity test in fathead minnow (*Pimephales promelas*) also gave a BCF value of 660 for EE_2 (Lange *et al.*, 2001). Considering the average weight of the juvenile medaka at 10 dph to be 3 mg, recalculation gave absorption values of approximately 0.31 to 0.35 ng of EE_2 after exposure to 158 ng/L of EE_2 . These absorption values were still lower than the LOED of 0.5 ng of EE_2 but higher than the

no-observed effective dose (NOED) of 0.1 ng from the EE_2 nanoinjection experiment. Our results also show that male to female sex-reversal occurred at 35 dph at exposure levels of 45.1 and 80.1 ng/L EE_2 , even though no effects were seen on germ cell proliferation at 10 dph. These observations suggest that continuous EE_2 intake from ≤ 158 ng/L of EE_2 -contaminated water over the period from 10 to 35 dph could have resulted in EE_2 absorption to levels above the threshold concentration necessary to induce feminization of the fish.

We investigated the availability of GFP fluorescence as a means to detect adverse effects on sexual differentiation, however, no significant differences were observed between the GFP fluorescence in normal testes and ovaries at 35 dph. This could be because of the difficulty in capturing the GFP images of the gonads in medaka at 35 dph due to the randomly locating fatty tissues surrounding the normally developed ovaries and testes. The significant decrease observed in the GFP-fluorescent area of the intersex gonads in 35 dph medaka exposed to 45.1 ng/L EE_2 was more due to the accidental localization of the gonads in the abdominal cavity of the fish rather than estrogenic effects of EE_2 (Fig. 3–14). These results indicate that the determination of sex phenotype on the basis of gonadal size through the calculation of the GFP-fluorescent areas in the fish can only be performed in the 10 dph juvenile medaka and not in the 35 dph medaka.

On the other hand, EE_2 at levels of ≥ 447 ng/L was seen to not only reduced germ cell numbers at 10 dph but also reduce GFP-fluorescent area and fluorescence intensity of the gonad at 35 dph. In male fathead minnows exposed to 10 nM (27 ng/L) of E_2 , Miles-Richardson *et al.* (1999) observed increased number of sertoli cells, which play a role in phagocytosis, with distended cytoplasm filled with degenerate spermatozoa and suggested an increase in necrosis or apoptosis of germ cells. The lesions observed in the present study might have occurred due to an increase in necrosis or apoptosis of germ cells and an arrest in germ cell maturation with subsequent degeneration of spermatozoa and oocytes. Meanwhile, the impairment of germ cell proliferation in XX females at 10 dph was transient

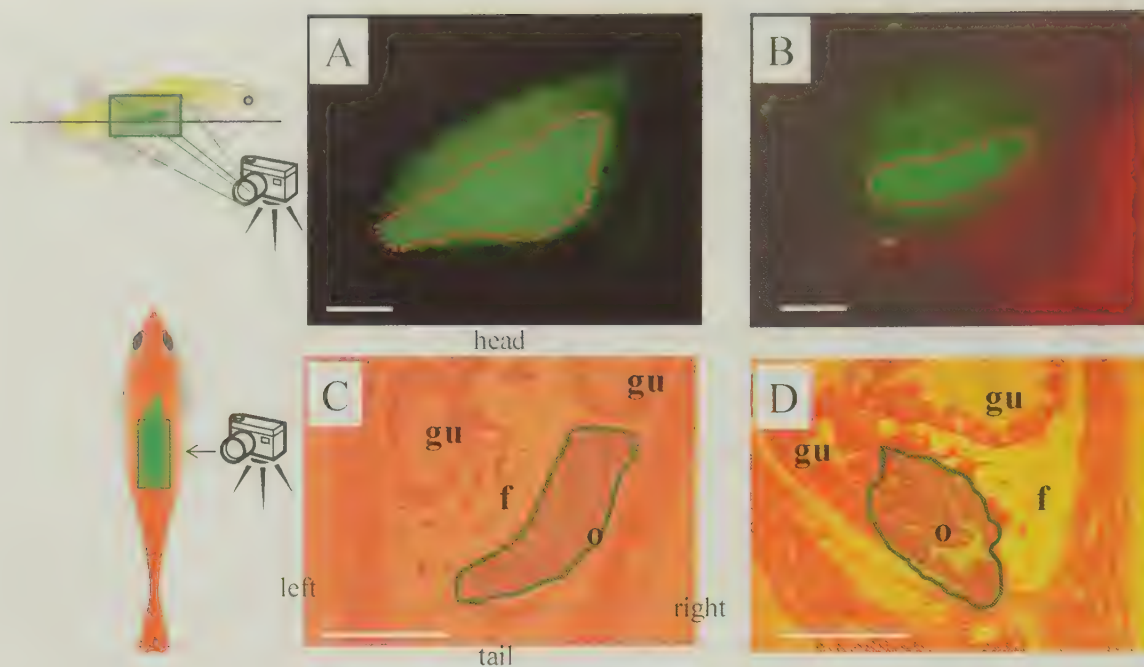


Fig. 3-14. Green fluorescent protein (GFP) images from the right lateral side of the fish and longitudinal sections of ovaries stained with hematoxylin and eosin at the end of 35 days EE_2 exposure. (A) Clearly identified GFP image of ovary. (B) Obscured GFP image of ovary surrounded with fatty tissues. (C) Longitudinal sectioned ovary (GFP image corresponds to A) located in the right lateral side in the abdomen cavity. (D) Longitudinal sectioned ovary (GFP image corresponds to B) located in the central region of abdomen cavity. O, ovary; f, fatty tissues; gu, gut. Bar = 0.5 mm (A-D).

in nanoinjection experiment: at 100 dph, mature XX females of all treatment groups had normal ovaries. They are explained by that EE_2 might be eliminated from the body and germ cell proliferation recovered as the fish continued to develop.

Sensitivity to EE_2 was evaluated in the transgenic *olvas-GFP/STII-YI* strain to examine its suitability as a fish model to screen for EDCs effects. In experiment-1, agreement of LOED of EE_2 (0.5 ng/egg) to induce male-to-female sex reversal was observed in an earlier study of the d-rR strain of medaka reported by Papoulias *et al.* (2000a). In waterborne experiment, the lowest observable effective concentration (LOEC) to increase germ cell proliferation in medaka at 10 dph and for the induction of male to female sex-reversal in medaka at 35 dph were found to be 158 and 45.1 ng/L, respectively. In an earlier study, Suzuki *et al.* (2005) had reported that $0.1 \mu\text{g/L}$ (100 ng/L) of E_2 was seen to enhance germ cell proliferation at 0 dph in the Hd-rR medaka strain. Other studies had reported

the skewing of the sex ratios towards females at $0.1 \mu\text{g/L}$ (100 ng/L) of EE_2 at approximately 100 dph (Metcalf *et al.*, 2001) and at $\geq 27.9 \text{ ng/L}$ of E_2 for 60 days from 1 dpf (Seki *et al.*, 2005) onwards in the orange-red strain of Japanese medaka. Taking all these findings together, if EE_2 and E_2 can be considered to be of approximately equal potency in the reproduction test in medaka (Seki *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002), the *olvas-GFP/STII-YI* strain may be predicted to show almost the same sensitivity to estrogenic chemicals as Japanese medaka.

Overall, the present study showed that the measurement of GFP-fluorescent area of the gonads could reveal abnormal germ cell proliferation by EE_2 , with a reversal of the male sex phenotype towards the female phenotype at 10 dph. However, the effects of EE_2 on proliferative activity of germ cells were less dramatic with exposure to waterborne EE_2 than with direct nanoinjection of EE_2 . Future studies focusing on germ cell proliferation in the *olvas-GFP/STII-YI* strain can be a useful aid in

elucidating not only unknown mechanism of sexual differentiation but also effects of EDCs on early development in fish.

Chapter 4. Effect of in ovo exposure of nonylphenol on sexual differentiation in the *olvas-GFP/STII-YI* strain

4.1. Introduction

Nonylphenol (NP), a bacterial degradation product of Nonylphenol Ethoxylates (NPEOs), has been detected at microgram-per-liter levels in the aquatic environment (Rudel *et al.*, 1998; Blackburn *et al.*, 1999; Tsuda *et al.*, 2000). Several *in vivo* studies have confirmed that NP has physiological and developmental effects related to its estrogenic potency, including reproductive failure, production of testis-ova and vitellogenin (Vtg) in NP-exposed medaka (*Oryzias latipes*; Kang *et al.*, 2003) and fathead minnow (*Pimephales promelas*; Harries *et al.*, 2000). Exposure of medaka to NP for 60 days from 0 days post-fertilization (dpf) result in significant decrease of hatchability and successful swim-up of hatched larvae at 183 $\mu\text{g/L}$ (Yokota *et al.*, 2001) and skewed the sex ratio toward females at 23.5 $\mu\text{g/L}$ (Seki *et al.*, 2003). In a full life cycle test using medaka, Yokota *et al.* (2001) showed that NP induced testis-ova in both parental medaka (F_0) at $\geq 17.7 \mu\text{g/L}$ and their progeny (F_1) at $\geq 8.2 \mu\text{g/L}$. They suggested that exposure of NP beginning *in ovo* and continuing throughout the early life stage of the F_1 generation induced the formation of testis-ova at lower concentrations than in the F_0 generation. This finding suggests that hydrophobic NP accumulated in fish is maternally transferred to the next generation via the eggs, however, it is not well known effective concentration of NP that is maternally transferred into eggs.

In chapter 4, we nanoinjected NP into the embryos of the *olvas-GFP/STII-YI* strain and observed its adverse effects on the development of embryo and juveniles and also performed bioimaging analysis of the gonads, using green fluorescent protein (GFP) fluorescence to assess the effects of NP on sexual differentiation.

4.2. Materials and Methods

4.2.1. Test organism

The *olvas-GFP/STII-YI* strain was maintained at Nagoya University. We used a line homozygous that almost 100% of embryos were theoretically GFP-positive. Parental fish at 60 days posthatch (dph) were kept in 16-L tanks with a water circulating system (MH; Meito-Suien, Nagoya, Japan) at 25 to 27 °C under a constant 14:10-h light:dark photoperiod and were fed three times daily ad libitum with *Artemia* nauplii (<24 h after hatching).

4.2.2. Embryo nanoinjection

Preparation of microneedles and nanoinjection were conducted according to the procedures described in chapter 3.2.1.1. Embryos were collected from breeding females in the morning, and healthy embryos were selected. The embryos were sterilized and washed (chapter 2.2.3. in detail) and were embedded in 2% agarose gel on glass slides just before nanoinjection. Within 8 h after fertilization, NP in triolein was injected at 2.0, 10, 50, 125, or 250 ng per egg, with about 80 embryos per dose group. NP was nanoinjected directly into the oil globule with the aid of a Femtojet and a micromanipulator. Embryos were also injected with NP-free triolein (triolein control) or were not injected (uninjected control). The treated embryos were washed and maintained in 10 mL of embryo rearing medium (chapter 2.2.3. in detail) in a 6-well multiwell plate at 25–27°C until hatching.

Mortality and abnormal development were assessed daily during the embryogenesis. Hatchability, swim-up failure and time-to-hatching were also assessed in the hatching embryos. Hatched juveniles were transferred to 1.8-L square glass containers (20 individuals per chamber) and maintained in dechlorinated tap water at 25–27 °C. Survival and growth were observed daily until they sexually mature for approximately 100 days. They were fed granulated freeze-dried brine shrimp (Tetra, Tokyo, Japan) around the onset of hatching and, as they grew up, they were fed with *Artemia* nauplii (< 24 h after hatching) twice a day.

4.2.3. NP working solution

The selected embryos were exposed via nanoinjection to NP (97.4% purity, consisting of a mixture of isomers, Kanto chemicals, Tokyo, Japan) dissolved in triolein (99.0% purity, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan). Triolein was filter-sterilized by passage through a 0.22 μm PTFE filter (Millipore, Bedford, USA) before use.

Prior to experiment, we conducted a preliminary toxicity test of NP. Thirty healthy eggs obtained from medaka stock were exposed to NP via nanoinjection at 500 ng/egg, and the toxicity of NP to the embryos was observed. Twenty-eight out of 30 eggs died within 24 h after injection and no embryonic body could be seen in the embryo. On the basis of the results of this toxicity test, we chose NP doses of 2, 10, 50, 125, and 250 ng/egg for this study. 3 ml of NP stock solution (500 ng/nl = 1500 mg/3 ml) was prepared by mixing the 1.579 ml of NP (1,500 mg, $d=0.950\text{ g/ml}$) and 1.421 ml of triolein (1,300 mg, $d=0.915\text{ g/ml}$). NP working solutions (4, 20, 100 and 250 ng/nl) were prepared by serial dilution of the stock solution with triolein.

4.2.4. Measurement and quantification of GFP fluorescent area at 10 dph juvenile

At 10 dph, all specimens that showed GFP fluorescence in their germ cells were anesthetized by being cooled in iced water. GFP expression was detected using equipments as described in chapter 3.2.2.2. GFP fluorescent images were recorded, analyzed and finally determined its area following previously outlined procedures in chapter 3.2.2.5.

After we had measured this area, all specimens were separated into three chambers per treatment and maintained for 100 days under the conditions described above. The first chamber held juveniles that had male-like gonad size (GFP area $<15,000\text{ }\mu\text{m}^2$) and leucophore cells in their skin; the second held juveniles that had female-like gonad size (GFP area $>15,000\text{ }\mu\text{m}^2$) but no leucophore cells; and the third held juveniles that had male-like gonads but no leucophores in their skin or female-like gonads and leucophores in their skin.

4.2.5. Characterization of adult fish at 100 dph

At 100 dph, the fish were anesthetized in ice

water, blotted on filter paper, and their body weight and total length measured. Then their development of secondary sex characteristics were assessed (chapter 3.2.1.6, *in detail*). Gonads and livers were removed and weighed to calculate the gonad somatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI). Finally, the caudal fin from each specimen was removed and subjected to extraction of the *SLI* marker for identification of the genotypic sex. Removed gonads were prepared for histological observation and serial transverse sections (thickness, 5 μm) were obtained following previously outlined histological procedures in chapter 3.2.2.6.

4.2.6. Determination of genotypic sex

Genetic sex in each individual at 100 dph was performed with polymerase chain reaction (PCR) analysis of sex-linked 1 (*SLI*) according to the procedures as described in chapter 2.2.2.

4.2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted according to the procedures in chapter 3.2.3.

4.3. Results

4.3.1. Survival and growth

NP showed lethal toxicity to medaka embryos (Table 4-1). Since no significant difference in survival was found between the triolein (0 ng NP/egg) and uninjected groups, they were pooled for statistical analysis. Survival at 1 dpf was significantly lower than in the pooled controls at a dose of 50 ng/egg or more ($p < 0.01$).

The number of hatched embryos was significantly reduced in all dose groups except the 10 ng/egg group (Table 4-1). The time to hatch was about 8 days in all treatments. Swim-up failure, which means that larvae were unable to survive for longer than 5 days, was significantly increased in the 50, 125, and 250 ng/egg treatment groups. Tails of affected larvae in these groups were usually bent at the tip, curled, shortened, or all three (Fig. 4-1). Affected larvae lay on their sides and swam little or were immobile. Consequently, in the 250 ng/egg treatment group, no individuals survived for longer than 10 days after hatching.

Table 4-1. Toxicity of nonylphenol (NP) to the medaka during embryogenesis and around the day of hatching

Dose (ng/egg)	Total No. of embryos injected	Survival at 1dpf	No. of embryos hatched ^a	Time to hatch (d)	Swim-up Failure	Survivors at 10dph ^b
Uninjected	79	71	70 (98.6)	8.0±0.5	2	65 (92.9)
Triolein	80	72	69 (95.8)	7.9±0.2	3	62 (89.9)
2	79	68	52 (76.5) * *	8.3±0.7	6	46 (88.5)
10	80	73	66 (90.4)	8.1±0.3	2	63 (95.5)
50	80	44 * *	35 (79.5) * *	8.7±0.6	6 *	29 (82.9)
125	80	55 * *	43 (78.2) * *	8.0±0.2	27 * *	13 (30.2) * *
250	80	10 * *	1 (10.0) * *	8.0	1 * *	0 (0)

^a Numbers in parenthesis indicate the relative proportion (in %) of survivors at 1 dpf (day post-fertilization).

^b Numbers in parenthesis indicate the relative proportion (in %) of hatched embryos.

* and ** denote significantly different from pooled control groups at $p<0.05$, $p<0.01$, respectively.



Fig. 4-1. Swim-up failed larvae at 1 day posthatch juvenile injected with 250 ng of nonylphenol (NP).

At 100 dph, the survival rates of hatched larvae were constant, with no significant differences between treatment groups and pooled controls (Table 4-2). Measurement of body weight and length at 100 dph gave no significant difference among treatment groups (Table 4-3).

4.3.2. Effect of NP on germ cell proliferation at 10 dph

No deleterious effects of NP on proliferation of germ cells were detected as early as 10 dph (Fig. 4-2). In each treatment, including in the

NP-treated groups, sexual dimorphism of the gonad between sexes was evident: that is, the area of GFP fluorescence differed significantly between the sexes in the pooled control group and in fish that developed from embryos treated with 2, 10, 50, or 125 ng/egg ($p < 0.01$). Furthermore, the extent of the GFP area did not differ significantly among treatment groups in the two sexes.

The numbers of juveniles that had male-like gonads but no leucophores in their skin or female-like gonads with leucophores in the skin were 3, 1, 7, 3, 2, and 1 in the uninjected, triolein, 2, 10, 50,

Table 4-2. Survival, phenotypic sex and gonadal histology of adult medaka (100 days posthatch) injected *in ovo* with nonylphenol (NP)

Dose (ng/egg)	No. of larvae normal hatched	No. of survivors at 100 dph (%) ^a	Gonad histology			
			Genotypic male ^{b,c}		Genotypic female ^{b,c}	
			Phenotypic male	Phenotypic female	Phenotypic male	Phenotypic female
Uninjected	68	57 (83.8)	33	0	0	24
Triolein	66	51 (77.3)	27	0	0	24
2	46	42 (91.3)	26	0	0	16
10	64	53 (82.8)	28	0	0	25
50	29	22 (75.9)	10	0	0	12
125	16	11 (68.8)	6	0	0	5

^a Numbers in parentheses indicate the relative proportion (in %) of normal hatched embryos.
^b No significant differences from pooled control groups at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.
^c Genotypic sex of each individual was determined by amplification of the sex-linked 1 (*SLI*) gene by polymerase chain reaction (PCR).

Table 4-3. Morphological characteristics of adult medaka (100 days posthatch) injected *in ovo* with nonylphenol (NP)

Dose (ng/egg)	XY male		XX female	
	Total length ^{a,b} (mm)	Body weight ^{a,b} (mg)	Total length ^{a,b} (mm)	Body weight ^{a,b} (mg)
Uninjected	32.1 ± 1.2 (33)	302 ± 42	32.0 ± 1.2 (24)	330 ± 58
Triolein	32.3 ± 1.1 (27)	309 ± 41	32.8 ± 1.8 (24)	359 ± 66
2	31.8 ± 1.3 (26)	295 ± 46	31.4 ± 1.7 (16)	301 ± 54
10	31.9 ± 1.1 (28)	296 ± 30	32.5 ± 1.3 (25)	330 ± 37
50	32.0 ± 2.0 (10)	324 ± 63	32.4 ± 2.2 (12)	380 ± 133
125	33.2 ± 1.4 (6)	331 ± 55	33.3 ± 4.0 (5)	469 ± 232

^a Numbers in parentheses indicate the numbers of fish examined. Data expressed as mean ± standard deviation.
^b No significant difference among treatments.

and 125 ng/egg groups, respectively. PCR analysis of *SLI* showed that recombination between the *lf* locus and sex-determinant (*SD*) locus occurred in all of these individuals, indicating no impairment on germ cell proliferation at 10 dph juvenile.

4.3.3. Sexual development at 100 dph

Among the surviving adults, including the

NP-treated fish, genotypic sex determined by amplification of *SLI* matched phenotypic sex determined by analysis of gonadal sex and secondary sex characteristics (Table 4-2). Histological observation of the gonad in both sexes also showed no abnormalities. XY males and XX females had normal GSI and HSI values, and no difference in them was observed between the NP-treated and the

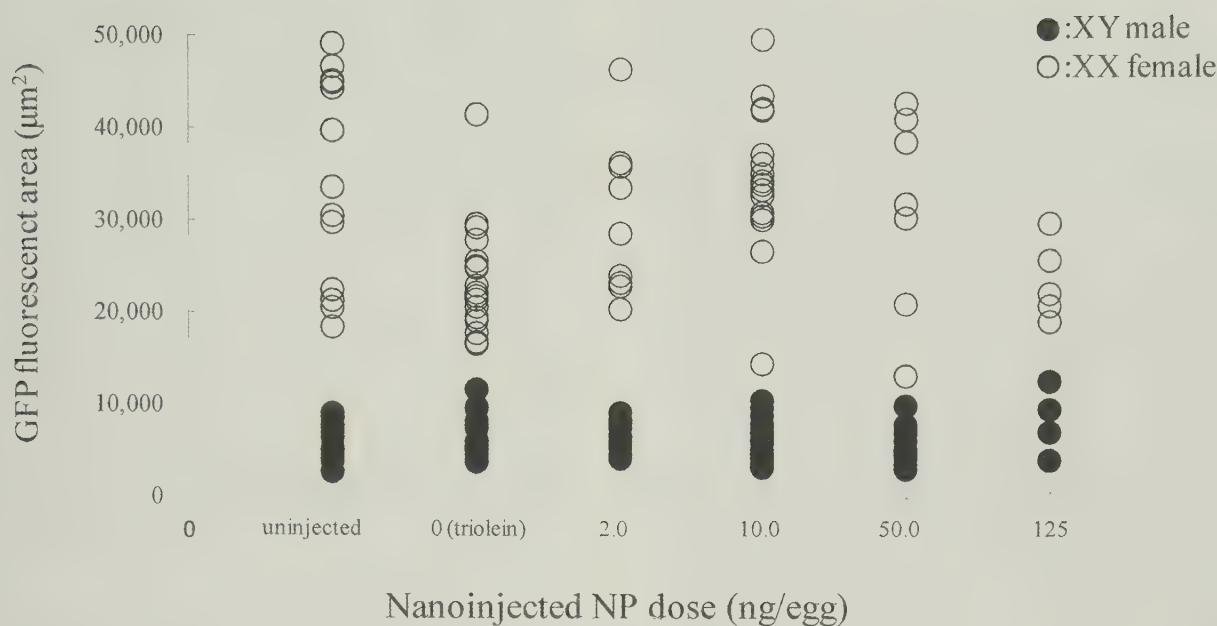


Fig. 4-2. Areas of green fluorescent protein (GFP) fluorescence plotted for individual fish (10 days posthatch) that developed from embryos injected with the indicated amounts of nonylphenol (NP).

pooled control groups (data not shown).

4.4. Discussion

Our results clearly showed that NP injection into medaka embryos of the *olvas-GFP*/STII-YI strain adversely affected embryonic development (Table 4-1and Fig. 4-1) but did not impair germ cell proliferation by 10 dph and sexual differentiation in adult fish by 100 dph (Table 4-2 and Fig. 4-2).

NP exerts estrogenic activity (Folmar *et al.*, 2002) and is also lethal to fish (Yokota *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2003). We detected deleterious effects of NP with respect to survival, hatchability and swim-up failure. Its toxic effect was evident as early as 1 dpf. The number of embryos hatched decreased significantly in all treatment groups except the 10 ng/egg group. The lowest observable effective dose (LOED) of NP on embryo survival is estimated to be between 0 and 2 ng/egg. Yokota *et al.* (2001) reported reduced embryo survival and swim-up success in medaka treated with 183 µg/L NP by waterborne exposure from 0 dpf; they also found increased mortality at ≥17.7 µg/L NP from 0 to 60 dph. In contrast, nanoinjected NP affected neither survival rates nor growth of surviving larvae up to 100 days. These differences in post-swim-up

mortality rates can probably be explained by successful metabolism and elimination of injected NP in surviving fish.

To detect changes in sexual differentiation, we focused on the different proliferation pattern of germ cells between sexes that occurs near the onset of gonadal differentiation. Although the reason for this difference between sexes is not understood well, histological and ultrastructural studies of gonad anlage in medaka suggest that gonadal sex differentiation does not depend on sex steroids in this species (Satoh, 1974). However, nanoinjection of EE₂ causes abnormal sexual differentiation in 10 dph juveniles of both sexes and in genotypic adult males at 100 dph at the same initial EE₂ levels (>0.5 ng/egg; Fig. 3-4 and 5). Nevertheless, in the present study we found no impairment by NP—an artificial estrogenic chemical— of germ cell proliferation in medaka juveniles or of sexual differentiation in adult medaka at any NP dose (2-125 ng/egg). On the other hand, Seki *et al.* (2003) reported that NP at >23.5 µg/L skewed the sex ratio toward females in medaka exposed for 60 days from 0 dpf. Folmar *et al.* (2002) also demonstrated that the estrogenic potency of NP was about 1% that of EE₂ for inducing Vtg production in sheepshead minnow (*Cyprinodon*

variegatus Lacépède). From these findings we had predicted that nanoinjected NP at 50 ng/egg — 100 times the EE₂ dose that induced sex reversal in the EE₂ nanoinjection study (>0.5 ng/egg; Table 3-1) and within the range of our test doses (2–250 ng/egg)— would be required to induce both abnormal sexual differentiation at 10 dph and sex reversal at 100 dph in medaka. In addition, we also chose the amounts of NP in which were presumably enough to induce sex-reversal because the LOED for inducing sex reversal is generally lower than the dose that causes acute toxicity to organisms (Papoulias *et al.*, 2000a; Edmunds *et al.*, 2000).

Two explanations for the failure of NP to impair the germ cell proliferation and sexual differentiation are possible. First, NP might be metabolized and/or excreted in the surviving embryos faster than expected, which could have made the NP concentration below the threshold concentration necessary to influence sexual differentiation during sensitive periods. Although the kinetics of NP in the fish embryo is not well known, Ishibashi

et al. (2006) reported the rapid decrease of NP concentration from 2–7 to <1 µg/g in the eggs spawned from female medaka that were exposed to NP at 61.2 µg/L for 21 days and then transferred to dechlorinated tap water for 7 days. In the present study, injected NP might be eliminated rapidly in the surviving embryo so that NP failed to exert its estrogenic activity enough to induce sex reversal.

Second, both germ cell proliferation by 10 dph and sexual differentiation in adult medaka might not be impaired by the only NP that maternally transferred from parental fish in the aquatic environment. In a full life cycle test using medaka, Yokota *et al.* (2001) showed that NP skewed sex ratio toward female in both parental medaka (*F*₀) at ≥51.5 µg/L and their progeny (*F*₁) at ≥17.7 µg/L and demonstrated that occurrence of biased sex ratio at lower concentration in *F*₁ than *F*₀ was explained by that NP might exert enhanced effects to the progeny generation through maternal transfer of NP into the *F*₁ embryos. Kogar and Hinton (2000) also showed that newly hatched fry, rather than intact

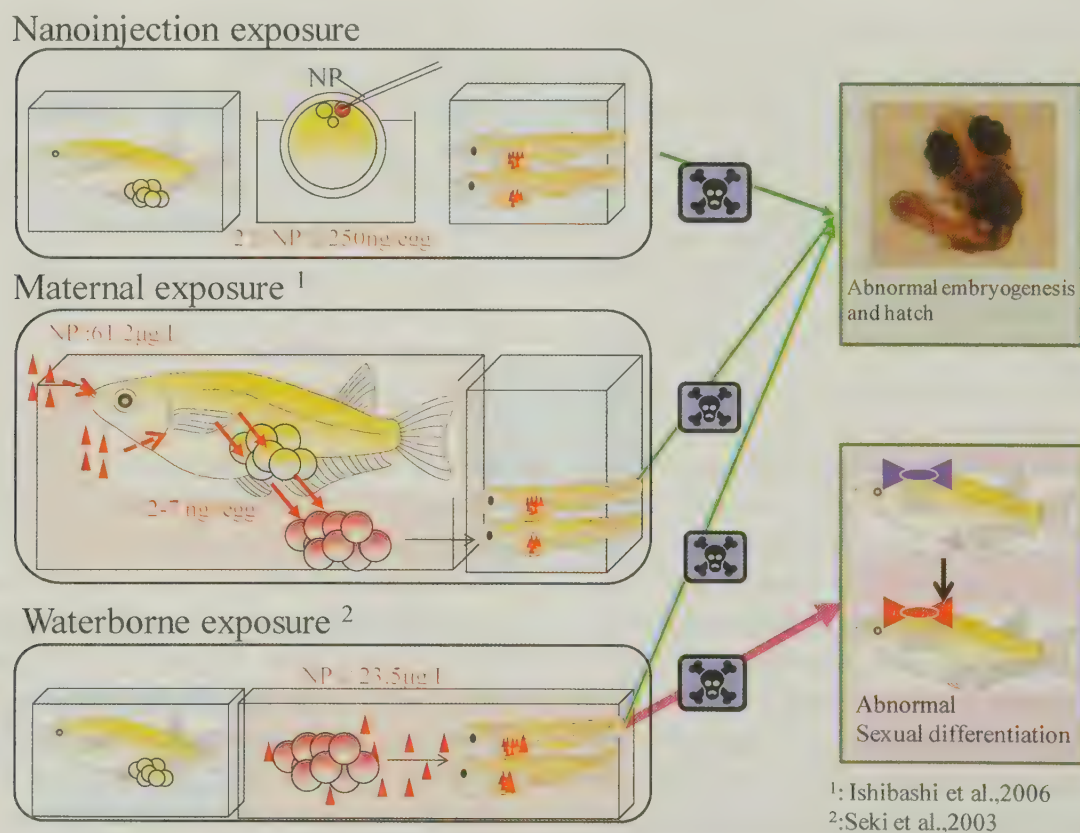


Fig. 4-3. Schematic images of nonylphenol (NP) exposure to medaka by nanoinjection, maternal transference to the next generation and waterborne exposure.

chorionated embryos, are the most developmental sensitive stages to 17β -estradiol. Additionally, Ishibashi *et al.* (2006) detected $2.7\ \mu\text{g/g}$ of NP from the eggs that were spawned from females exposed to averaged measured concentrations of $61.2\ \mu\text{g/L}$ of NP, which was about half of concentration that impairs the reproduction of adult medaka (Kang *et al.*, 2003). When calculated based on average medaka egg weight of 1 mg, NP concentrations per egg was 2–7 ng, which was higher than estimated LOED in this study and is much lower than the dose that we had predicted the sex reversal would be induced (50 ng/egg). Together with these findings, absorption of NP via the NP-contaminated water after hatch as well as maternally transferred NP might play a key role in the induction of abnormal sexual differentiation in the medaka (Fig. 4-3).

In summary, our results clearly demonstrated that a single *in ovo* injection of NP into the medaka embryo impaired embryonic development but not germ cell proliferation by 10 dph and sexual differentiation in adult fish by 100 dph. Although further investigations might be needed to elucidate the usefulness of nanoinjection of embryos of the *olvas-GFP/STII-YI* strain in detecting the estrogenic effects of other EDCs, the nanoinjection model has potential for use in evaluating the effects of chemicals on early development and sexual differentiation in fish.

Chapter 5. Effect of 17α -ethinylestradiol on matured gonad in the *olvas-GFP/STII-YI* strain

5.1. Introduction

As previously described in chapter 1, we selected 17α -ethinylestradiol (EE_2) as a test chemical because it has strong estrogenic potency (Folmar *et al.*, 2002) and has been detected in many sewage treatment work effluents and in many surface waters. The concentrations of EE_2 in river surface waters were relatively low and reported to be a few nanograms per liter (Belfoid *et al.*, 1999). Despite the frequently low environmental concentrations of EE_2 , high levels of EE_2 concentrations to these lower values is a recent survey of U.S. waters that reported EE_2 concentrations ranging 73 to 831 ng/L (Kolpin *et al.*, 2002). These high levels of concentrations were

critical to aquatic organisms, previously reported as impairment of reproductive capabilities in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 488 ng/L of EE_2 for 3 weeks (Seki *et al.*, 2002). Impairment of reproductive capacity derives from decreases in fertility, and lesioned gonad by estrogenic chemicals, in which abnormal connective tissues was developed, was found to be causative (Kang *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002). Considering that abnormal changes in fish testicular structure have been found in the aquatic environment (Gill *et al.*, 2002), it is important to develop a facilitated system to monitor the gonadal change adversely affected by temporarily high levels of estrogenic chemicals released into the environment. In addition, although many studies have focused on the effect of estrogenic compounds on the testis, little is known whether testis lesions and impaired spermatogenesis induced by estrogenic chemicals can be reconstituted in adult medaka transferred to clean water.

In the present chapter, we examined the effects of different concentrations of EE_2 on matured male and female gonads in the *olvas-GFP/STII-YI* strain and further investigated the chorological changes of testis after the exposed males are transferred to clean water.

5.2. Materials and Methods

5.2.1. Direct waterborne exposure

5.2.1.1. Test organism

Olvas-GFP/STII-YI strain were maintained at Nagoya University. Medaka selected for this study were approximately 60 days posthatch and were fully mature (body weight, $334 \pm 6\ \text{mg}$; total length, $33 \pm 2\ \text{mm}$). They were kept in 16-L tanks with a water circulating system (MH; Meito-suien, Nagoya, Japan) at 26°C under 14:10-h light:dark photoperiod and fed three times daily ad libitum with *Artemia* nauplii (<24 h after hatching).

5.2.1.2. Measurement and quantification of GFP fluorescent area

Prior to the initiation of exposure, test specimens whose gonads had intensive green fluorescent protein (GFP) fluorescence were selected from

stocks and anesthetized in ice water on a petri dish (60 × 15 mm). GFP expression was detected using equipments as described in chapter 3.2.2.2. GFP fluorescent images were recorded analyzed and finally determined its area following previously outlined procedures in chapter 3.2.2.5. All GFP images of the gonads were captured from the right lateral side of the fish, to reduce artificial measurement errors.

Prior to experimentation, the GFP fluorescent image, and total length and body weight of each test specimen were recorded for each individual to observe the change between initiation and end of exposure. In males, the distribution pattern of leucophore, a sex-specific pigment (Wakamatsu *et al.*, 2003), was also used in identifying each individual.

5.2.1.3. Special reagents

EE₂ was purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). An EE₂ stock solution (100 mg/L) was prepared by dissolving the reagent in acetone. An aliquot was then evaporated to dryness under N₂ gas, diluted with deionized water, and magnetically stirred for approximately 24 h to resolve the EE₂ in water (1 mg/L). This aqueous solution was diluted with dechlorinated water to prepare a working EE₂ stock solution of 9 μg/L.

5.2.1.4. Exposure design

The selected fish were exposed to EE₂ in a flow-through mini-diluter system, as previously described in chapter 3.2.2.4. Fish were maintained under 14:10-h light: dark photoperiod and fed *Artemia* nauplii ad libitum twice daily. Residual food and feces were carefully removed each day; hardness, pH, and temperature of test solutions was monitored periodically. Throughout the experimental period, hardness in the water was 20–30 mg CaCO₃/L and pH was 6.7–7.0. Water temperature remained at 24 ± 1°C. Medaka were observed daily to assess mortality and appearance.

Mature medaka were exposed to EE₂ for 4 weeks in test glass chambers (235 × 110 × 70 mm) that contained about 1.8-L of test solution. Each treatment consisted of 3 glass chambers holding a total of 10 males and 8 females: 1 chamber had 6 males and the other 2 chambers contained 2 males

and 4 females each, because we had assumed that higher mortality would occur in males than in females according to previous study (Seki *et al.*, 2002), and our preliminary study had found that the optimum ratio of male to female in each chambers was 1 to 2, to maintain normal ovarian maturation in this strain (data not shown). Fecundity and fertility were not pre-assessed.

At the end of the exposure period, each medaka was anesthetized on ice, and their fluorescent image and area recorded. Average growth rate in each treatment was calculated by averaging the ratio of gonadal size of 4th week to that of day 0 for each individual per treatment. Specimens were then blotted on filter paper and measured for body weight and total length. Gonads and livers were removed and weighed to calculate the gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI). Removed gonads were prepared for histological observation following previously outlined histological procedures in chapter 3.2.2.6. Serial transverse sections (thickness, 6 μm) were obtained from male fish gonads, and 6 total section slides were prepared from the females. The determination of testis-ova and connective tissue was based on previous studies (Kang *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002).

EE₂ concentrations were measured every 2 weeks. The means (coefficients of variation) of measured EE₂ concentrations in each of test solutions during the exposure period were 47.8 (41.1), 94.8 (32.3), 216 (8.6), and 522 (26.2) ng/L. The EE₂ concentration in the control treatment was less than the detection limit (2.0 ng/L) in all analyses.

5.2.1.5. Determination of EE₂ concentration in the test solution

The concentrations of EE₂ in the test solutions were measured periodically during the exposure period according to the procedures described in chapter 3.2.2.7.

5.2.2. Waterborne exposure followed by depuration

In the same kind of flow-through system described in chapter 5.2.1.4, mature medaka (6 males per treatment) were exposed for 3 weeks to EE₂, followed by 6 weeks of culture in clean water, in order to investigate the persistent effects of EE₂.

One glass chamber was prepared per treatment. The experimental exposure period was shortened to 3 weeks because of high early mortality in ≥ 215 ng/L treatments probably due to anesthesia in ice-water. *In vivo* fluorescent images of GFP were obtained continuously, once a week through the whole experimental period (0–9 weeks) for the control, 215, and 473 ng/L treatments and only on the 0, 1, 2, 3, 6 and 9th week for the 43.7 and 85.8 ng/L treatments, since dramatic changes were not expected at lower concentrations. At the end of the experiment, surviving specimens were sampled following previously outlined histological procedures in chapter 3.2.2.6.

EE₂ concentrations in test solutions were measured once a week. The means (coefficients of variation) of measured EE₂ concentrations in test solutions during the exposure period were 43.7 (35.7), 85.8 (31.0), 215 (6.1), and 473 (26.9) ng/L.

5.2.3. Statistical analysis

In the direct exposure experiment, the experimental data were checked for homogeneity of variances and assumptions of normality across treatments by Levene’s test. When the assumptions were met, the data were subjected to analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet’s Multiple comparison test. When the data failed to meet the assumptions, the Kruskal Wallis test was used followed by a Mann Whitney test with Bonferroni’s adjustment. To compare the GSI and HSI among all treatment groups, gonad weight was log-transformed and then analyzed by analysis of covariance (ANCOVA), using the body weight of

individuals as the covariate. Correlations between the GFP-fluorescent area and male and female gonad weight were assessed by Kendall’s test. All statistical analyses were completed using the 10.0J SPSS Base System (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

In the depuration experiment, the log of transformed GFP fluorescence area values at 3 weeks were compared by Tukey’s multiple comparison test. The treatments were grouped into G1 (control, 43.7, and 85.8 ng/L) and G2 (215 and 473 ng/L), based on no significant differences among the treatments forming these groups. The area values at 9 wk were then analyzed by ANOVA. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Assuming a second order spline function of time and dose, the best model that is fitted to the data was selected by evaluating AIC (Akaike’s information criterion) using SAS (SAS Institute Inc, NC, USA).

5.3. Results

5.3.1. Direct waterborne exposure

5.3.1.1. Mortality and abnormal appearance in medaka during EE₂ exposure.

During the exposure period, adult medaka in the ≥ 216 ng/L treatment groups exhibited pathological lesions such as lightened body color, swollen abdomen and subcutaneous hemorrhage (Table 5–1). Death occurred in 3 males and 4 females from the ≥ 216 ng/L treatment groups, showing these lesions (Table 5–1). In females with a swollen abdomen, the ovary was visibly shrunken and located in the

Table 5–1. Mortality and pathological responses in medaka during the experimental period in direct exposure.

EE ₂ concn. (ng/L) ^a	Male					Female				
	N	Mortality	Lightened body color	Swollen abdomen	Subcutaneous hemorrhage	N	Mortality	Lightened body color	Swollen abdomen	Subcutaneous hemorrhage
Control	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0
47.8	10	1	0	0	0	8	0	0	0	0
94.8	10	0	0	0	0	8	0	0	0	0
216	10	2	4	0	0	8	2	4	5	4
522	10	1	3	2	3	8	2	2	4	1

^a Mean measured concentration during the exposure period.

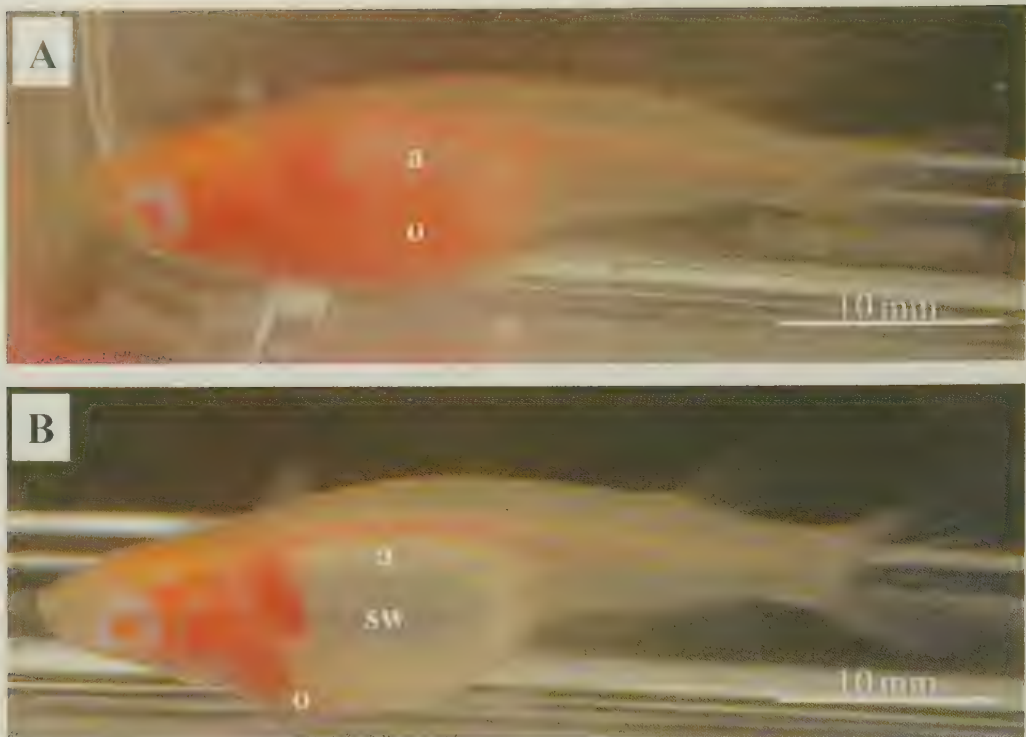


Fig. 5-1. Appearance of a *olvas-GFP/STII-YI* strain medaka at the end of EE_2 exposure. (A) 0 ng/L (control) female. (B) Abnormal appearance of a female medaka that showed swollen abdomen exposed to 522 ng/L. a, air bladder; o, ovary; sw, swollen abdomen. STII, see-through II.

Table 5-2. Changes in area of green fluorescent protein (GFP) fluorescence and average growth rate during the exposure period

		GFP area of the gonad(mm ²) ^b		Average growth rate in the same individuals ^b (end/initiation)
EE_2 concn. (ng/L) ^a		0 wk (Initiation of exposure)	4 wk (End of exposure)	
Male	Control	3.60 ± 1.07 (10)	3.93 ± 1.10 (10)	1.11 ± 0.25 (10)
	47.8	2.98 ± 1.19 (10)	3.81 ± 0.85 (9)	1.39 ± 0.45 (9)
	94.8	3.27 ± 1.07 (10)	3.16 ± 1.49 (10)	0.98 ± 0.35 (10)
	216	3.17 ± 1.21 (10)	0.97 ± 0.70 (8)**	0.30 ± 0.20 (8)**
	522	3.35 ± 1.15 (10)	0.99 ± 0.41 (9)**	0.33 ± 0.14 (9)**
Female	Control	10.5 ± 2.59 (8)	14.7 ± 5.50 (8)	1.37 ± 0.30 (8)
	47.8	12.8 ± 3.20 (8)	13.9 ± 6.01 (8)	1.18 ± 0.67 (8)
	94.8	8.57 ± 2.96 (8)	17.3 ± 2.24 (8)	2.23 ± 0.78 (8)
	216	8.48 ± 2.69 (8)	8.73 ± 3.12 (6)	1.09 ± 0.52 (6)
	522	10.4 ± 4.52 (8)	5.57 ± 4.59 (6)*	0.53 ± 0.29 (6)**

^a Mean measured concentration during the exposure period.
^b Data expressed as mean ± standard deviation. Numbers in parenthesis indicate number of individuals sampled.
* and ** denote significant difference from control treatment group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

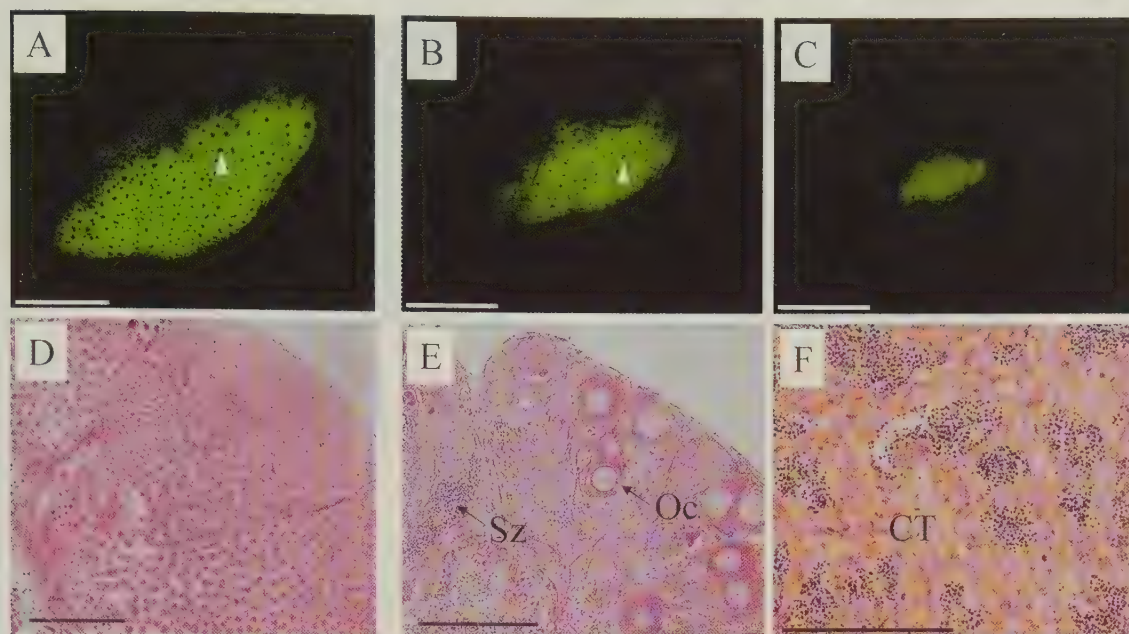


Fig. 5-2. Green fluorescent protein (GFP) images from the right lateral aspect of the male fish (A-C) and transverse sections of testes at the end of 4 week 17 α -ethinylestradiol (EE₂) exposure period stained with hematoxylin and eosin (D-E). (A) GFP image of a 0 ng/L (control), (B) 94.8 ng/L of EE₂ and (C) 522 ng/L of EE₂. Histological section of (D) control testis, (E) testis-ova exposed to 94.8 ng/L of EE₂ (E), and (F) development of connective tissue exposed to 522 ng/L of EE₂. Arrowhead: leucophore, a male specific pigment. CT, abnormal connective tissues; Oc, oocytes; Sz, spermatozoa. Bar = 1.0 mm (A-C) and 100 μ m (D-F).

viscera around the liver (Fig. 5-1). One male died in the 47.8 ng/L treatment group, but without lesions or abnormal pathology. None of the control fish died or developed any lesions.

5.3.1.2. Changes in GFP fluorescent area between the initiation and the end of EE₂ exposure

Table 5-2 shows the changes and ratio in GFP fluorescent area in the individuals exposed to EE₂. In males, average GFP-fluorescent area at the initiation of exposure was constant, with no significant differences among treatment groups ($p=0.805$). However, by the end of exposure, GFP-fluorescent area in the ≥ 216 ng/L treatment groups had declined to approximately 30% of the size at the initiation of exposure ($p<0.001$), with a simultaneous decrease in intensity of GFP fluorescence (Fig. 5-2C). In contrast, no significant changes were observed in both control and ≤ 94.8 ng/L treatment groups. (Table 5-2).

The same trend was observed in females (Table 5-2). Average GFP fluorescent area at initiation was

constant and without significant differences among groups ($p=0.455$). At the end of exposure, the GFP fluorescent area of specimens in only the 522 ng/L treatment group decreased by half and therefore were significantly different from the controls ($p=0.002$) (Table 5-2 and Fig. 5-3B). Significant correlations between fluorescent area and gonad weight were detected in EE₂-treated and control males ($R=0.76$, $p<0.01$) and females ($R=0.70$, $p<0.01$) at the end of exposure (Fig. 5-4).

5.3.1.3. GSI and HSI of fish exposed to EE₂

The GSI of male medaka showed a significant decrease in the 216 ng/L and 522 ng/L ($p<0.001$, both) treatment groups, as compared with the control group (Table 5-3a). In contrast, the HSI of male medaka treated with 522 ng/L EE₂ for 4 weeks was significantly higher than the controls ($p=0.00974$), but not significant in the ≤ 216 ng/L treatment groups. In female fish, there was a significant difference in GSI between control and 522 ng/L groups ($p=0.013$), but not in HSI ($p=0.379$).

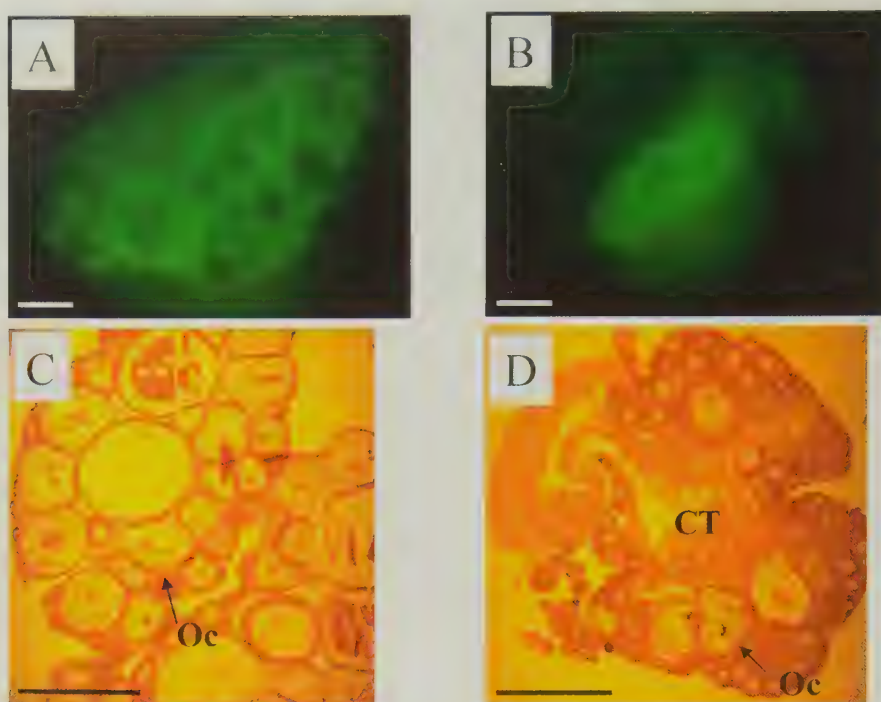


Fig. 5-3. Green fluorescent protein (GFP) images from the right lateral aspect of the female fish (A,B) and transverse sections of ovaries at the end of 4 week 17α -ethinylestradiol (EE_2) exposure period stained with hematoxylin and eosin (C,D). (A) GFP image of a 0 ng/L(control) ovary and (B) regressed ovary exposed to 522 ng/L of EE_2 . Histological section of (C) control ovary and (D) regressed ovary exposed to 522 ng/L of EE_2 . Oc, oocytes; CT, abnormal connective tissues. Bar = 1.0 mm (A-D).

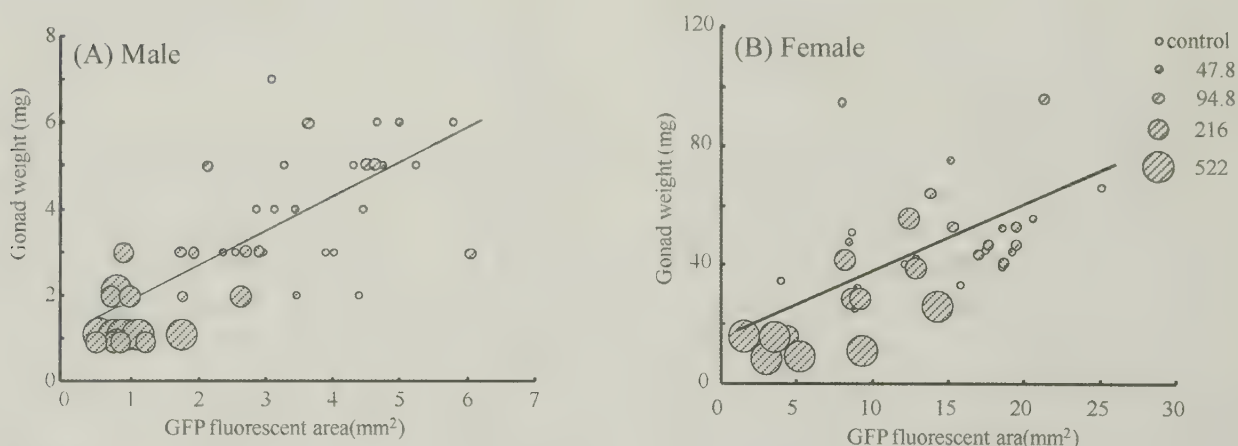


Fig. 5-4. Correlation between green fluorescent protein (GFP) fluorescent area and gonad weight in males (A) and females (B) for all treatment groups. Significant relationships between them were observed in males ($R=0.76$, $p<0.01$) and in females ($R=0.70$, $p<0.01$).

(Table 5-3a).

5.3.1.4. Histological observation of the gonad at the end of exposure

Testis-ova were observed in male medaka from

all EE_2 treatment groups (Table 5-3a and Fig. 5-2E). In the testis-ova gonads of the 47.8 and 94.8 ng/L treatment groups, spermatocytes and spermatids could still be identified, indicating active spermatogenesis. However, in the ≥ 216 ng/L

Table 5-3. Gonadosomatic index (GSI), hepatosomatic index (HSI) and results of histology in gonad of adult medaka at the end of direct exposure (Table5-3a) and depuration experiment (Table5-3b)

EE ₂ concn. (ng/L) ^a	N	GSI(%) ^b	HSI(%) ^b	testis			ovary	
				Normal testis	Testis-ova	Abnormal connective tissue	Developed ovary	Regressed ovary ^c
Table 5-3a (direct exposure male)								
Control	10	1.33±0.40	2.04±0.38	10	0	0		
47.8	9	0.90±0.30	1.94±0.39	3	6	0		
94.8	10	0.94±0.23	2.11±0.84	3	7	0		
216	8	0.39±0.14 ⁺	3.03±1.00	0	5	6		
522	9	0.33±0.09 ^{**}	3.48±0.72 ^{**}	0	5	7		
Table 5-3a (direct exposure female)								
Control	8	8.67±2.14	3.08±0.66				8	0
47.8	8	10.0±4.08	3.48±0.66				8	0
94.8	8	11.1±3.63	3.69±0.85				8	0
216	6	8.29±2.36	3.54±0.38				6	0
522	6	4.00±1.97 [*]	3.78±0.83				0	6
Table 5-3b (depuration experiment male)								
Control	5	1.12±0.22	1.62±0.26	5	0	0		
43.7	5	1.20±0.32	2.29±0.80	5	0	0		
85.8	6	1.10±0.30	2.56±0.54	2	4	0		
215	4	1.07±0.45	3.05±1.30	2	2	0		
473	1	1.07	2.60	0	1	0		

^a Mean measured concentration during the exposure period.
^b Data expressed as mean ± standard deviation.
^c Ovary with many previtellogenic oocytes.
^{*} and ^{**}denote significant difference from control treatment group at *p*<0.05 and *p*<0.01, respectively.

treatment groups, few oocytes were observed in the testis and almost the whole area in the testis of each specimen was composed of abnormally developed connective tissues, with only a few spermatozoa and spermatocytes present (Fig. 5-2F). In ovaries, histological abnormalities were not found in control and ≤216 ng/L treatment groups (Fig. 5-3C). However, in the 522 ng/L treatment, many previtellogenic oocytes and abnormal connective tissue were observed in the ovary of all specimens, indicating a regressed condition of the ovaries (Fig. 5-3D).

5.3.2. Waterborne exposure followed by depuration

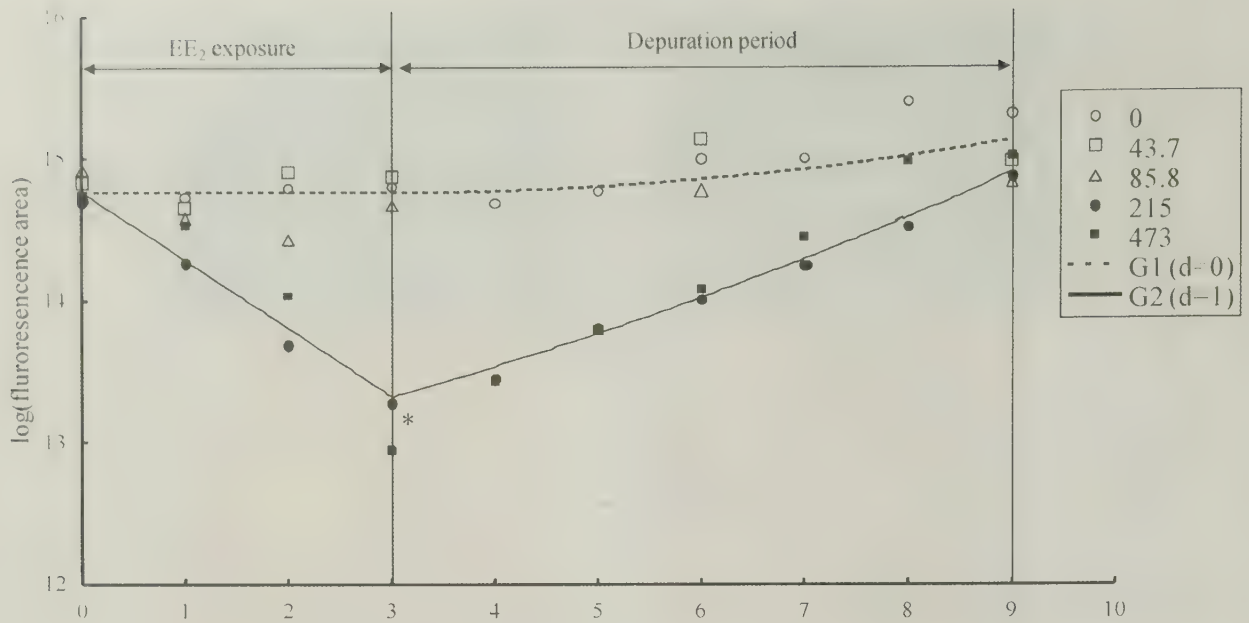
5.3.2.1. Mortality and abnormal appearance in medaka during the experimental period

Two weeks after the initial exposure, the 215 and 473 ng/L treatment groups had 2 and 1 dead males, respectively. At three weeks, 4 males died in the 473 ng/L treatment group. Dead specimens displayed the characteristic antemortem symptoms

such as lightened body color, swollen abdomen and subcutaneous hemorrhage (data not shown). One male each also died in the control and 47.8 ng/L treatment groups, in the fifth and ninth weeks, respectively. After transfer to clean water, surviving specimens seemed to recover well and appear normal.

5.3.2.2. Changes in GFP fluorescent area during the EE₂ exposure phase and clean water phase

In the control and ≤ 85.8 ng/L treatment groups, the GFP fluorescent area was not significant between the initial and the final value (Fig. 5-5). In the third week, the GFP-fluorescent area in the 215 and 473 ng/L treatment groups had decreased to 29% and 19% of that in week 0, respectively, as did the intensity of fluorescence (Fig. 5-5, 5-6B). Due to a lack of differences in areas for certain groups of dose levels, values for GFP-fluorescent area were grouped into G1 (control, 43.7, and 85.8 ng/L) and G2 (215 and 473 ng/L) for analysis (Fig. 5-5). At week 3, the area of GFP fluorescence in the G2 group had



$$S_d(t) = 14.766 + 0.0102(t-3)_+^2 - 0.479d + 0.680d(t-3)_+ \quad \text{week}$$

where

$$d = \begin{cases} 0 & (\text{if control, 43.7, or 85.8}) \\ 1 & (\text{if 215, or 473}) \end{cases}$$

$S_d(t)$: log transformed area of fluorescence

and

$$(t-3)_+ = \begin{cases} 0 & t < 3 \\ t-3 & t \geq 3 \end{cases}$$

Fig. 5-5. Changes in average green fluorescent protein (GFP) fluorescent area in the same individuals during the experimental period. Values for GFP-fluorescent area were grouped into G1 (control, 43.7, and 85.8 ng/L) and G2 (215 and 473 ng/L) for analysis (see Results for details). * denotes significant difference from G1group at $p < 0.05$.

significantly decreased to 23.7% of G1 ($p=0.033$). These reductions in area were associated with a high prevalence of connective tissue in the testis, a condition that was expected to be irreparable. Interestingly, the area of GFP fluorescence in testis began to reconstitute its size soon after the EE_2 exposure ceased. There were no differences in GFP-fluorescent area among treatment groups by the end of the experiment (9 weeks) (Fig. 5-5, 5-6C). As a result of second order spline function model selection, we believe the best model for the area of GFP fluorescence is described in Fig. 5-5.

5.3.2.3. GSI and HSI of fish, and comparison with histological observation of the gonad after transfer of exposed fish to clean water.

GSI and HSI of exposed male fish after their transfer to clean water clearly reflected the

observed recovery of GFP-fluorescent area (Table 5-3b), as significant differences among the treatment groups disappeared ($p=0.930$ and $p=0.10$ for GSI and HSI, respectively). The final histological analysis also demonstrated a substantial reconstitution of the testis (Table 5-3b). Males from the 43.7 ng/L treatment group had no testis-ova and normal-appearing testis with active spermatogenesis. In the ≥ 85.8 ng/L treatment groups, some individuals still had testis-ova; however, the occupancy of oocytes in the testis had obviously declined. Moreover, not only had abnormal connective tissues completely disappeared in the 215 and 473 ng/L treatment groups, but active spermatogenesis was evident, with many spermatocytes and spermatozoa observed (Fig. 5-6D).

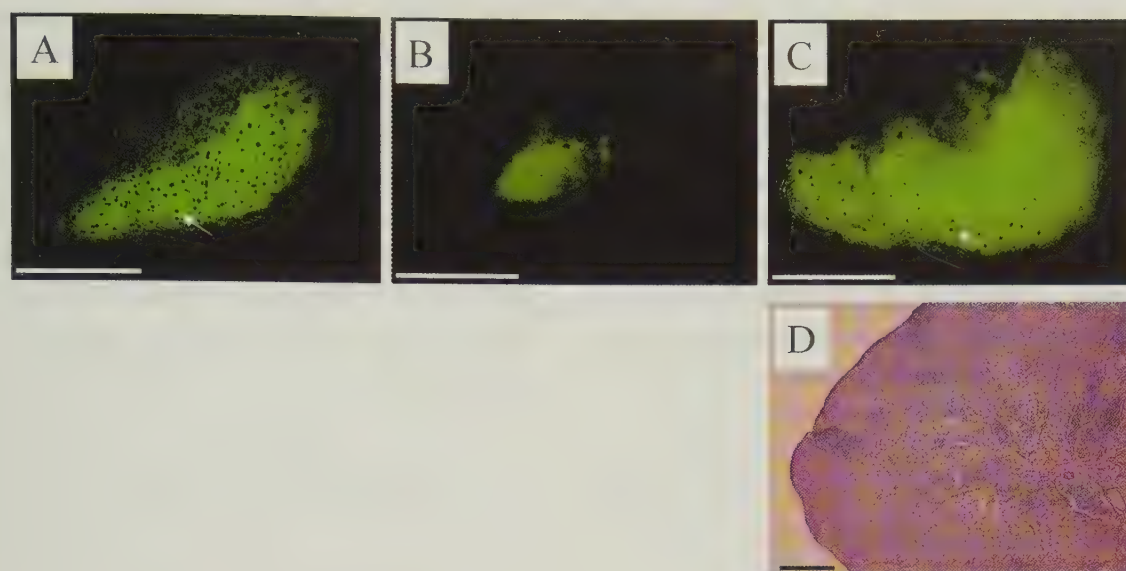


Fig. 5-6. Chronological changes of green fluorescent protein (GFP) images in the same individuals from the right lateral aspect of the male fish exposed to 522 ng/L of 17 α -ethinylestradiol (EE₂) for 3 weeks followed by culture in clean water for 6 weeks (A-C) and transverse sections of testis at the end of experiment stained with hematoxylin and eosin (D). GFP image of a male fish at the initiation of the exposure (0 wk., A), at the end of EE₂ exposure (3rd week.,B) and after the transfer to clean water for 6 weeks (9th week., C). Histological section of reconstituted spermatogenesis in the testis (D). Arrow = leucophore, a male specific pigment. Bar = 1.0 mm (A-C) and 500 μ m (D).

5.4. Discussion

Present study clearly showed that observation of matured gonad by GFP fluorescence could monitor the gonadal changes adversely affected by EE₂ and the recovery of testis after the exposed males are transferred to clean water.

EE₂ caused pathologic abnormalities such as lightened body color, swollen abdomen and subcutaneous hemorrhage, and finally leading to lethality. Transparent body of this strain made it much easier to observe these abnormal appearances. Significantly increased HSI in males might be associated with abnormal vitellogenin (Vtg) synthesis in the liver (Seki *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2002). Seki *et al.* (2002) suggested that excessive Vtg levels in males exposed to estrogens may cause lethal and sublethal toxicities.

The increase in mortality in depuration experiment might be associated to the more frequent anesthetizing in ice-water, that was necessary to observe the GFP-fluorescent in living medaka. In the 473 ng/L treatment group, 3 of 5 dead specimens showed pathologic abnormalities and unfortunately died in the third week, just after

the anesthesia. Mortality in the control and 47.8 ng/L treatment groups may also be attributed to anesthesia in ice-water. An alternative anesthetizing method that is less stressful to the specimens is necessary to be developed so that they can endure frequent observation.

Significant reductions were observed in the gonad's GFP-fluorescent area and GSI of adult males in the 216 and 522 ng/L, and females in the 522 ng/L treatment exposed to EE₂ for 4 weeks. Development of abnormal connective tissues in the testis induced by estrogens might be ascribed to the inhibition of spermatogenesis at the concentrations in which reproduction failed (Seki *et al.*, 2002). Greater concentrations of E₂ also resulted in preponderance of primary follicles and in the presence of several atretic follicles in fathead minnows (Miles-Richardson *et al.*, 1999). Scholz and Gutzeit (2000) reported a reduced GSI in female medaka exposed to 10 and 100 ng EE₂/L for 6 weeks. Such lesions also might have been caused by an alteration or disruption of the hypothalamic-pituitary axis with the subsequent suppression of follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) (Miles-Richardson

et al., 1999). In the present study, a sublethal EE₂ concentration in which abnormal connective tissue and a significant reduction of GSI was induced, corresponded with a significant reduction in the GFP-fluorescent area and average growth rate. These results confirm that the GFP-fluorescent area of the gonad does serve to indicate the histological conditions of test specimens exposed to reproduction-impairing concentrations of toxicant. Additionally, there were significant relationships found between gonad weight and the area of GFP fluorescence in both sexes (Fig. 5-4). This implies that there is a possibility of predicting the gonad weight by only measuring the area of GFP fluorescence, which might obviate the need for dissecting specimens of this test organism.

Adverse effects of EE₂ on the female gonad were also observed. In the 522 ng/L treatment, the fluorescent area of atrophied ovary was significantly smaller than the untreated control and the intensity of GFP fluorescence was quite strong because the atrophied ovary was mostly composed of previtellogenic oocytes (Fig. 5-3). Oocyte size or intensity of GFP fluorescence facilitated detection of the effects of EE₂ in females. This regressed condition of the ovary likely arose from compromised ovarian development (Scholz and Gutzeit, 2000), as EE₂ might exert ovary-specific toxicity and/or interfere with the release of gonadotropins, which have been shown to stimulate ovarian development (Chan, 1976).

After the removal of exposure to EE₂, continuous observation of the gonad for GFP fluorescence revealed that there was a rapid reconstitution of the normal testis tissue structure and some spermatogenic ability, indicating that the effects of EE₂ on adult testis are reversible. Although testis-ova were still present in some specimens, their incidence was apparently lower than with direct exposure experiment. Similar results had been reported by Shibata and Hamaguchi (1988), and our findings indicated that, EE₂ influences spermatogonia to develop into oocytes; however, when animals were allowed to recover from EE₂ exposure, the inhibition of spermatogenesis ceased and these oocytes disappeared.

Some studies on the recovery of fish after

exposure to estrogens have been conducted at the early life stages or juvenile fish during sex determination. The functional and morphological recovery of the gonad was observed in hermaphrodite species, zebrafish (*Zebra danio*; Fenske *et al.*, 2005), but not in differentiated gonochorist species, medaka (Seki *et al.*, 2003). These findings and present study indicated that the ability to recover may depend on time, duration, species and concentration of estrogen exposure.

Possible mechanisms for the histological reconstitution of exposed fish testis after transfer to clean water might be explained by the contribution of Leydig cells in testis. Yamamoto (1953) demonstrated the sexual biopotentiality of germ cells in developing gonads after sexual differentiation persists. Germ cells differentiate into spermatocytes under the influence of androgen, which is typically synthesized in the testis' Leydig cells (Miura and Miura, 2001). During direct exposure experiment and the exposure portion of depuration experiment, and even among testis almost completely filled with abnormally developed connective tissues, the Leydig cells remained present. Counting the Leydig cell numbers and morphological examinations were not conducted in this study, because their small size (<5 μm) contributed to difficulties in their observation and identification under the light microscope. However, Cavaco *et al.* (1999) reported that E₂ did not induce morphological changes in Leydig cells in the juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). It is likely that androgen synthesized in the Leydig cells after the transfer of exposed fish to clean water might play an important role in restoring spermatogenesis.

We have further elucidated the atrophied and regressed condition of EE₂-exposed testis and its reconstitution after transfer from different concentrations of EE₂ solution to clean water. This fact implies that the testis might indeed be reparable even after pathological changes occurred at the tissue level in response to the exposure with EE₂. Fish and other aquatic organisms are inhabitants of rivers, estuaries, and bays, where they may receive a large amount of industrial and domestic sewage effluent. Their reproductive organs would be impaired by exposure to different

levels of environmental estrogens discharged by the effluent into their aquatic environment. Gill ME *et al.* (2002) reported abnormal hypertrophy of connective tissues in testicular structure in wild male flounders that were collected from the lower Tyne estuary in northeast England, a heavily impacted site known to contain high levels of endocrine disrupting chemicals (EDCs). Hashimoto *et al.* (2000) also reported that some male flounders (*Pleuronectes yokohamae*) collected from Tokyo Bay in Japan had testes containing small numbers of oocytes. Our experimental findings indicate that these observations may be explained by exposure to estrogenic compounds. Our present study suggests that some males that show testicular lesions after exposure to estrogens would be able to regain their reproductive functions after cessation of exposure to environmental estrogens.

In summary, we have visualized the impairment to both gonads and the recovery of testis by GFP fluorescence, through the exposure and the removal of EE₂ in mature *olvas-GFP/STII-YI* strain. Observation of the gonad with GFP fluorescence enabled us to detect the regressed condition of the gonad caused by EE₂ in living individuals. Furthermore, continuous observation of the testis with GFP fluorescence throughout the exposure and depuration period permitted the tracing of chronological changes from atrophy to restitution of the testis *in vivo*, in the same individuals. This is the first report of the effects of EDCs on the gonad in a living model using mature transgenic organisms. Overall, our findings showed that this strain could be applied to facilitated screening fish model to detect the adverse effects on the gonad exposed estrogenic chemicals.

Chapter 6. General Discussion

This study was performed to evaluate the effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the *olvas-GFP/STII-YI* strain by monitoring gonad development with green fluorescent protein (GFP) fluorescence in a living organism.

In chapter 2, we described a novel method that was established to determine the germ cell number before the onset of sexual differentiation, at about

0 to 15 days posthatch (dph), by measuring the area of GFP fluorescence in the *olvas-GFP/STII-YI* strain. Germ cell number and GFP area show an approximately 10-fold increase in female gonads when compared with the germ cell number and GFP area in male gonads in 10 dph juveniles, which thus facilitates sexing of very young fry as early as 10 dph, as indicated by the appearance of GFP-fluorescent germ cells. Identification of germ cell number by either calculating GFP-fluorescent germ cells or measuring the GFP area is less laborious and time consuming than conventional histological techniques. Therefore, we set abnormal germ cell proliferation as a target endpoint, which is critical to organisms and may induce sex reversal.

In the EE₂ exposure experiment (chapter 3), we quantitatively analyzed GFP fluorescence and detected abnormally enhanced germ cell proliferation by visualizing GFP-positive germ cells. Thus, the *olvas-GFP/STII-YI* strain, in which germ cell proliferative activity is targeted, should have a potential for application in the detection of the effects of EDCs on the gonad. However, a drawback of this model to determine the target endpoint is less sensitive to chemicals than the other established transgenic lines. As we mentioned in chapter 3, the lowest observable effective concentration (LOEC) of 17 α -ethinylestradiol (EE₂) for enhancing germ cell proliferation was 158 ng/L, whereas that in the GFP transgenic medaka (*Oryzias latipes*) line under the medaka vitellogenin1 (*mvtg1*) promoter was 50 ng/L (Zeng *et al.*, 2005). Chen *et al.* (2010) further established a highly sensitive transgenic zebrafish (*Zebra danio*) line (*ere-zvtg1 gfp*; estrogen response element zebrafish vitellogenin 1) that showed GFP expression with as low as 0.1 ng/L EE₂. They suggested that the high sensitivity may be due to the addition of an estrogen response element (ERE) upstream of the vitellogenin 1 (*vtg1*) promoter. To improve the sensitivity to EDCs in the *olvas-GFP/STII-YI* strain, it might be sufficient to establish transgenic fish under the control of a 2 or more different inducible promoters, for example, both *olvas* (critical) and *ere-vtg1* (sensitive).

In chapter 3, we described how we performed *in ovo* exposure of chemicals with the nanoinjection technique. Nanoinjection is an alternative exposure

method that can directly expose developing embryos to chemicals instead of exposing adult fish to waterborne chemicals; in this technique, the chemicals deposit naturally into the oocytes (Walker *et al.*, 1996). In the environment, lipophilic contaminants might readily bioaccumulate in fish and translocate from adult female body stores into the eggs during oocyte maturation (Niimi, 1983; Miller, 1993). Bioaccumulation of these chemicals in adult fish may have significant effects on the development and survival of their offspring because early-stage embryos are more sensitive than adults are to chemical toxicants. Thus, the presence of persistent, bioaccumulative contaminants in the environment may pose a risk to the early-stage survival of fish and ultimately limit their recruitment into adult populations. The present study clearly demonstrated that nanoinjection of EE₂ impaired survival and normal hatching and also induced either abnormal enhancement of germ cell proliferation in 10 dph XY fish or sex reversal in 100 dph XY medaka. Nanoinjection of nonylphenol (NP) and tributyltin (TBT) into medaka embryos also impaired survival and hatching (Hano *et al.*, 2007 and Chapter 4). Nassef *et al.* (2010) nanoinjected triclosan, diclofenac, and cabamazepine, which are compounds found in pharmaceuticals and personal-care products, into medaka embryos and detected toxicity-induced responses during embryonic development, including decreased hatchability and failed swim-up. Furthermore, nanoinjection has been proposed as a useful exposure method to elucidate the joint toxicity of chemicals (Nassef *et al.*, in preparation). Talykina (2003) also nanoinjected genotoxins (TBT and mixtures of polychlorinated naphthalene) into medaka embryos and applied the piscine micronuclear test to detect erythrocyte micronuclei. Ekman (2003) presented a new approach to nanoinjection by using it as a tool to mimic the vertical transmission of pathogens in rainbow trout. With this approach, nanoinjection provides a large amount of information for environmental risk assessments, and future investigations based on new concepts will broaden the usefulness and potential of the nanoinjection method.

The present study offers an additional consideration with regard to the behavior of

chemicals in the aquatic environment. Although NP did not affect either germ-cell proliferation or sexual differentiation, the study of NP nanoinjection in chapter 4 is of great importance in that NP kinetics in the aquatic environment was elucidated between maternally transferred NP doses from exposed breeding females and that of nanoinjection. In addition, failure of NP to impair either germ cell proliferation or sexual differentiation indicated that NP were metabolized or excreted faster than expected, and that maternally transferred NP alone is not enough to induce abnormalities in germ cell proliferation or sexual differentiation.

With regard to EE₂, both *in ovo* and waterborne exposure of EE₂ enhanced germ cell proliferation in 10 dph juveniles; however, germ cell proliferative activity showed dissimilar response to EE₂ at 10 dph in the 2 experimental designs. Bioconcentration factor was used as an estimate of the bioaccumulation potential of EE₂. The amount of EE₂ intake via waterborne exposure (0.31–0.35 ng/fish) was predicted to be much lower than the lowest observable effective dose (LOED) to induce germ cell proliferation in the *in ovo* exposure experiment (0.5 ng/egg). To the best of our knowledge, this is the first report to investigate the dissimilar responses to EDCs on germ cell proliferation observed in 2 different exposure designs.

The comparison of the concentration of EDCs between maternally transferred into eggs and that of nanoinjected EDCs has been studied in organotins such as TBT and triphenyltin (TPT). Hano *et al.* (2007) observed that nanoinjection of TBT induced embryologic abnormalities, including ocular defects and hemorrhage, and further indicated that the LOED for inducing decreased hatchability in medaka (0.16 ng/egg) was around the concentration levels in the eggs of marine fish [0.091 ng/egg (Takahashi *et al.*, 1997) and 0.431 ng/egg (Suzuki *et al.*, 1992)]. Furthermore, this value was in agreement with the TBT concentrations required to induce decreased hatchability in the eggs that were spawned from medaka pairs dietary exposed to dietary TBT (>0.123 ng/egg; Nakayama *et al.*, 2005). Hu *et al.* (2009) nanoinjected environmentally relevant levels of TPT into the eggs of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and observed both ocular and morphological

malformations. These observations indicated that the incidence of deformities in fish larvae is an indicator of the overall population-level effects of organotin on aquatic organisms, because EDCs, including organotin, at environmentally relevant concentrations can result in a significant decrease in both the quality and quantity of eggs and the spawning frequency of fish.

In chapter 3, we discussed how the identification of leucophore and sex-linked 1 marker played an important role in the confirmation of abnormal sexual differentiation of the gonad caused by EE₂ at 10, 35 and 100 dph. In previous studies, prior to the identification of genotypic sex markers, abnormal sexual differentiation had been assessed by the sex ratios of males to females between control and chemical treatment groups. The sex of each individual was identified by gross examination of secondary sex characteristics and by gonad histology. However, this traditional assessment has the disadvantage of unavoidable uncertainty because the sex ratios of control groups are unstable and it is necessary to lengthen the exposure duration until specimens show secondary characteristics, for example, 60 days or longer from hatching; it also demands additional laborious and time-consuming work. Identification of sex markers allows for detecting the genotypic sex of each individual at any stage of development and provides a more practical choice; for example, it shortens the exposure duration or requires less labor intensive work. In addition to these sex markers, detection of *DMY* (*Doublesex* and *Mab-3* domain gene on the medaka Y chromosome) would be helpful to rapidly detect abnormal sexual differentiation.

In chapter 5, we have visualized the impairment of mature gonads and the recovery of testis in the same individuals through the exposure and subsequent removal of EE₂. In normal gonads of 60 dph medaka adults, the testis can be distinguished from the ovary with the naked eye. Observation of the gonads with GFP fluorescence enabled detection of the EE₂-induced regression of the gonads in living organisms. Furthermore, continuous observation of the testis with GFP fluorescence throughout the exposure and depuration periods allowed the tracing of chronological changes from atrophy to restitution

of the testis in the same organisms. These results suggest that some males that show testicular lesions after exposure to estrogens would be able to regain their reproductive functions after cessation of exposure to environmental estrogens. This is the first report to analyze the effects of EDCs on the gonad by monitoring chronological changes in the same and living model by using mature transgenic organisms. Furthermore, monitoring GFP-fluorescent gonads in the same specimen could be a promising noninvasive approach to identify the effects of chemicals on the gonad. For example, in depuration experiment of chapter 5, 30 males (6 males per treatment multiplied by 5 treatments) were prepared to monitor gonadal changes for 9 weeks periodically, whereas 222 individuals were calculated to be necessary if we were to use nontransgenic medaka for the same experimental design. This indicated that the use of the *olvas-GFP/STII-YI* strain reduced by 86% the need for animal sacrifice as well as the required time and labor.

Recently, a transgenic fish model has been generated for researches on evolution, organ development, diseases, and aquaculture. Punnamoottil *et al.* (2010) used GFP reporter gene constructs in zebrafish to identify noncoding sequences conserved around the *Hox4* genes, which are key regulators of anterior-posterior axis patterning and have a major role in hindbrain development, and characterized *cis*-regulatory sequences in the Hox clusters as expression enhancers of *Hox4* genes. The authors further elucidated that *cis*-regulatory sequences are conserved during evolution, but their functions have significantly evolved. McDermott *et al.* (2010) labeled hair cells with GFP in the inner ear and lateral line of the zebrafish and investigated aural development. Hu *et al.* (2010) produced another zebrafish transgenic line in which the *GFP* gene driven by the keratin 5 gene promoter is expressed in the tongue and may be used for future studies on oral development and carcinogenesis. In the field of aquaculture, Kobayashi *et al.* (2007) produced transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) that overexpressed the growth hormone gene throughout their bodies and that displayed high food-conversion efficiency, shorter rearing period, and reduced ammonia excretion than nontransgenic fish. The

present proposed approach has the potential to reduce the amount of nitrogen pollution caused by farmed fish and to further lessen the pollution problem in the aquatic environment.

Furthermore, a biomonitoring system to detect xenobiotic toxicants in the environment has been developed by inducing the *GFP* gene under the control of the target gene promoter, and it can be a good candidate for detecting the modulating effects of chemicals in living organisms. In zebrafish, Mattingly *et al.* (2001) reported a GFP transgenic line using the human CYP1A1 promoter, which is capable of responding to 10 nM TCDD (2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-*p*-dioxin). Blechinger *et al.* (2002) used a heat-shock-inducible hsp70:GFP transgenic line to detect cadmium toxicity and observed GFP expression in the gill, olfactory system, and liver. In an experiment on medaka, Kurauchi *et al.* (2005) produced a transgenic line harboring the *GFP* gene driven by the regulatory region of choriogenin H gene. They observed GFP expression of the liver in the male medaka in response to estrogens and showed that the transgenic line was sufficient for application as an alternative model in monitoring environmental water samples. Kinoshita *et al.* (2009) later produced transgenic medaka whose oocytes were labeled with GFP using the regulatory region of the *42Sp50* gene, which was expected to be abundantly expressed in the oocytes (Kanamori, 2000). After treatment with 830 ng/L estradiol-benzoate, testis-ova were also labeled with GFP in the matured testes in this transgenic medaka strain. Overall, the development of transgenic fish will help in more efficiently meeting the demand for human life and will greatly benefit various fields of research.

In addition to the proposed toxicological model, the *olvas-GFP/STII-YI* strain has potential to be used as an aid in elucidating the unknown mechanism of sexual differentiation. Shiraishi *et al.* (2008) demonstrated that Mullerian inhibiting substance (MIS) is required for germ cell proliferation in loss-of-function experiments with MIS and MIS receptor type II by using the *olvas-GFP/STII-YI* strain. Recent studies have also proved that the male-sex-determining gene *DMY* is a key factor that regulates germ cell proliferation in the medaka

XY gonad (Matsuda *et al.*, 2007). However, the mechanisms underlying *DMY* function and the factors involved in sexual differentiation remain to be determined. Analysis of functional *DMY* protein should provide further insights into the mechanisms of germ cell proliferation and induction of germ cell proliferation by exogenous estrogens in male medaka.

In summary, the present study clearly showed that monitoring germ cells with GFP fluorescence by using the *olvas-GFP/STII-YI* strain allows rapid detection of the adverse effects of EE₂, a representative estrogenic chemical, on sexual differentiation or mature gonads in intact living fish. This result indicated that the transgenic line test model can provide a more practical choice and has the combined advantages of both *in vivo* and *in vitro* assays: an on-line and on-site evaluation for the effect of EDCs. In other words, it is directly observable, easy to analyze, rapid, and accurate. Further studies to investigate a variety of chemicals will elucidate the usefulness of this transgenic strain as a facilitated screening fish model to detect EDC-induced abnormalities in sexual differentiation. Although the *olvas-GFP/STII-YI* strain was designed for monitoring germ cells only, the same concept and technology would also be applicable to other environmental pollutants by replacing the inducible promoters. In the near future, it is possible to develop multicolor transgenic fish by using 2 or more fluorescent protein reporter genes under different inducible promoters, and thus, the same transgenic fish can be used for monitoring different types of environmental pollutants.

Reference

- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL. 1985. The *c-myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**: 533-538.
- Aida T. 1921. On the inheritance of color in a fresh water fish *Aplocheilichthys latipes* Temminck and Schlegel, with special reference to the sex-linked inheritance. *Genetics* **6**: 554-573.

- Amsterdam AM, Lin S, Hopkins N. 1995. The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **171**: 123-129.
- Belfoid AC, Van der Horst A, Vethaak AD. 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Sci. Total Environ.* **225**: 101-108.
- Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. 1982. A continuous-flow minidiluter system for toxicity testing. *Water Res.* **16**: 457-464.
- Blackburn MA, Kirby SJ, Waldock MJ. 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **38**: 109-118.
- Blechliger SR, Warren JT Jr, Kuwada JY, Krone PH. 2002. Developmental Toxicology of Cadmium in Living Embryos of a Stable Transgenic Zebrafish Line. *Environ. Health Perspect.* **110**: 1041-1046.
- Brar NK, Waggoner C, Reyes JA, Fairey R, Kelleys KM. 2010. Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. *Aquat. Toxicol.* **96**: 203-215.
- Cavaco JEB, Blijswijk B van, Leatherland JF, Goos HJTh, Schulz RW. 1999. Androgen-induced changes in Leydig cell structure and steroidogenesis in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus*. *Cell Tissue Res.* **297**: 291-299.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Chan KK. 1976. Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) on ovarian development in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Can. J. Zool.* **55**: 155-160.
- Chen H, Hu J, Yang J, Wang Y, Xu H, Jiang Q, Gong Y, Gu Y, Song H. 2010. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. *Aquat. Toxicol.* **96**: 53-61.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **101**: 378-384.
- Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environ. Sci. Tech.* **32**: 1549-1558.
- Edmunds JSG, McCarthy RA, Ramsdell JS. 2000. Permanent and functional male-to-female sex reversal in d-rR strain medaka (*Oryzias latipes*) following embryo microinjection of *o,p'*-DDT. *Environ. Health Perspect.* **108**: 219-224.
- Ekinan E, Åkerman G, Balk L, Norrgren L. 2003. Nanoinjection as a tool to mimic vertical transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* **55**: 93-99.
- Fenske M, Maack G, Schafers C, Segner H. 2005. An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 1088-1098.
- Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ Jr. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health. Perspect.* **104**: 1096-1100.
- Folmar LC, Hemmer MJ, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, Richman H, Meredith H, Grau EG. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethinylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat. Toxicol.* **60**: 101-110.
- Geyer H, Politzki G, Freitag D. 1984. Prediction of ecotoxicological behavior of chemicals: Relationship between n-octanol/water partition coefficient and bioaccumulation of organic chemicals by *Alga Chlorella*. *Chemosphere* **13**: 269-284.
- Giger W, Brunner PH, Schaffner C. 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science* **225**: 623-625.
- Gill ME, Spiropoulos J, Moss C. 2002. Testicular structure and sperm production in flounders from a polluted estuary: a preliminary study. *J.*

- Exp. Mar. Biol. Ecol.* **281**: 41-51.
- Gray LE, Ostby JS, Kelce WR. 1994. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol. Appl. Pharm.* **129**: 46-52.
- Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. 1994. Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environ. Health. Perspect.* **102**: 680-688.
- Hamada K, Tamaki K, Sasado T, Watai Y, Kani S, Wakamatsu Y, Ozato K. 1998. Usefulness of the medaka β -actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Marine Biol. Biotech.* **7**: 173-180.
- Hano T, Oshima Y, Kim S. G., Satonne H, Oba Y, Kitano T, Inoue S, Shimasaki Y, Honjo T. 2007. Tributyltin causes abnormal development in embryo of medaka, *Oryzias latipes*. *Chemosphere* **69**: 927-933.
- Harbers K, Kuehn M, Delius H, Jaenisch R. 1984. Insertion of retrovirus into the first intron of alpha 1(I) collagen gene to embryonic lethal mutation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1504-1508.
- Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Tec.* **34**: 3003-3011.
- Hashimoto S, Bessho H, Hara A, Nakamura M, Iguchi T, Fujita K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Mar. Environ. Res.* **49**: 37-53.
- Hegrenes S. 1999. Masculinization of spawning channel catfish in the red river of the north. *Copeia* **2**: 491-494.
- Holthaus KIE, Johnson AC, Jurgens MD, Williams RJ, Smith JJJ, Carter JE. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 2526-2535.
- Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, Morita M. 1997. Imposed in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. *Appl. Organomet. Chem.* **11**: 451-455.
- Howell WM, Black DA, Bortone SA. 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally-induced masculinization. *Copeia* **4**: 676-681.
- Hu B, Zhang C, Baawo K, Qin R, Cole GJ, Lee JA, Chen X. 2010. Zebrafish K5 promoter driven GFP expression as a transgenic system for oral research. *Oral Oncol.* **46**: 31-37.
- Hu J, Zhang Z, Wei Q, Zhen H, Zhao Y, Peng H, Wan Y, Giesy JP, Li L, Zhang B. 2009. Malformations of the endangered Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, and its causal agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 9339-9344.
- Ikawa M, Kominami K, Yoshimura Y, Tanaka K, Nishimune Y, Okabe M. 1995. Green fluorescent protein as a marker in transgenic mice. *Dev. Growth Differ.* **37**: 455-459.
- Ishaq R, Akerman G, Naf C, Balk L, Bandh C, Bröman D. 1999. Organic pollutant characterization and toxicity testing of settling particulate matter by nanoinjection in sea trout (*Salmo trutta*) eggs. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 533-543.
- Ishibashi H, Hirano M, Matsumura N, Watanabe N, Takao Y, Arizono K. 2006. Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* **65**: 1019-1026.
- Iwamatsu T. 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechan. Dev.* **121**: 605-618.
- Jaenisch R and Mintz B. 1974. Simian virus 50 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 1250-1254.
- Jensen KM, Kahl MD, Makynen EA, Korte JJ, Leino RL, Butterworth BC, Ankley GT. 2004. Characterization of response to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. *Aquat. Toxicol.* **70**:

- 99-110.
- Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brightly G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 2498-2506.
- Jones PA, Baker VA, Irwin AJE, Earl LK. 1998. Interpretation of the in vitro proliferation response of MCF-7 cells to potential oestrogens and nonoestrogenic substances. *Toxicol. in Vitro* **12**: 373-382.
- Kanamori A. 2000. Systematic identification of genes expressed during early oogenesis in medaka. *Mol. Reprod. Dev.* **55**: 31-36.
- Kang IJ, Hano T, Oshima Y, Yokota H, Tsuruda Y, Shimasaki Y, Honjo T. 2006. Anti-androgen flutamide affects gonadal development and reproduction in medaka (*Oryzias latipes*). *Mar. Environ. Res.* **62**: S253-S257.
- Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Hano T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. 2003. Effect of 4-nonylphenol on the reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 2438-2445.
- Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Chemosphere* **47**: 71-80.
- Kang IJ, Yokota H, Tsuruda Y, Shimasaki Y, Honjo T. 2008. The effects of methyltestosterone on the sexual development and reproduction of adult medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* **87**: 37-46.
- Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Nakahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, Higashinakagawa T. 1998. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* **393**: 688-692.
- Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* **375**: 581-585.
- Kinoshita M, Kani S, Ozato K, Wakamatsu Y. 2000. Activity of the medaka translation elongation factor 1 α -A promoter examined using the GFP gene as a reporter. *Dev. Growth Differ.* **42**: 469-478.
- Kinoshita M, Okamoto G, Hirata T, Shinomiya A, Kobayashi T, Kubo Y, Hori H, Kanamori A. 2009. Transgenic Medaka Enables Easy Oocytes Detection in Live Fish. *Mol. Reprod. Dev.* **76**: 202-207.
- Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M, Morohashi K. 2002. Mutation of *ARX* causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nature Genetics* **32**: 359-369.
- Kobayashi S, Alimuddin, Morita T, Miwa M, Lu J, Endo M, Takeuchi T, Yoshizaki G. 2007. Transgenic Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion. *Aquaculture* **270**: 427-435.
- Kobayashi T, Matsuda M, Kajiura-Kobayashi H, Suzuki A, Saito N, Nakamoto M, Shibata N, Nagahama Y. 2004. Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* **231**: 518-526.
- Kogar CS and Hinton DE. 2000. Determining the sensitive developmental stages of intersex induction in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol and testosterone. *Mar. Environ. Res.* **50**: 201-206.
- Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. 2004. Screening for Estrogen and Androgen Receptor Activities in 200 Pesticides by *In Vitro* Reporter Gene Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Health. Perspect.* **112**: 524-531.
- Kolphin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 1202-1211.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* **351**: 117-121.
- Körner W, Bolz U, Süßmuth W, Hiller G, Schuller W, Hanf V and Hagenmaier H. 2000. Input/output

- balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* **40**: 1131-1142.
- Krumlauf R, Chapman VM, Hammer RE, Brinster R, Tilghman SM. 1986. Differential expression of α -fetoprotein genes on the inactive X chromosome in extraembryonic and somatic tissues of a transgenic mouse line. *Nature* **319**: 224-226.
- Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, Hori H, Kurihara R, Hashimoto S, Ohnuma R, Yamamoto Y, Matsuoka S, Kawai S, Hirata T, Kinoshita M. 2005. In vivo visual receptor system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 2762-2768.
- Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hmpe P, Panter GH, Sumpter JP. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales Promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 1216-1227.
- Matsuda M, Kusama T, Oshiro T, Kurihara Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 1997. Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes*. *Genes & Genetic Systems* **72**: 263-268.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. 2002. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* **417**: 559-563.
- Matsuda M, Shinomiya A, Kinoshita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul PB, Lau EL, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y. 2007. DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 3865-3870.
- Mattingly CJ, McLachlan JA, Toscano WA Jr. 2001. Green Fluorescent Protein (GFP) as a Marker of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Function in Developing Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Health Perspect.* **109**: 845-849.
- Mcdermott BM Jr, Asai Y, Baucom JM, Jani SD, Castellanos Y, Gomez G, McClintock JM, Starr CJ, Hudspeth AJ. 2010. Transgenic labeling of hair cells in the zebrafish acousticolateralis system. *Gene Expr. Patterns* **10**: 113-118.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 297-308.
- Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effect of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* **47**: 129-145.
- Miller MA. 1993. Maternal transfer of lipophilic contaminants in Salmonines to their eggs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **40**: 306-312.
- Miura T and Miura C. 2001. Japanese eel: a model for analysis of spermatogenesis. *Zool. Sci.* **18**: 1055-1063.
- Munkittrick KR, McMaster ME, Portt CB, Van der Kraak GJ, Smith IR, Dixon DG. 1992. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed function oxygenase activity and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *Can. J. fish Aquat. Sci.* **49**: 1560-1569.
- Murata K, Sugiyama H, Yasumasu S, Iuchi S, Yasumasu I, Yamagami K. 1997. Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 2050-2055.
- Nakamura M and Takahashi H. 1973. Gonadal sex differentiation in tilapia *Tilapia mossambica*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. *Bull Fac Fish Hokkaido Univ* **24**: 1-13.
- Nakayama K, Oshima Y, Nagafuchi K, Hano T, Shimasaki Y, Honjo T. 2005. Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, *oryzias latipes*, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 591-596.

- Nassef M, Kim SG, Seki M, Kang IJ, Hano T, Shimasaki Y, Oshima Y. 2010. In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* **79**: 966-973.
- Niimi AJ. 1983. Biological and toxicological effects of environmental contaminants in fish and their eggs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**: 1405-1413.
- Organization for Economic Cooperation and Development. 1999. Final report from the OECD expert consultation meeting, London, UK.
- Oshima Y, Kang IJ, Kobayashi M, Nakayama K, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. 2002. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 β -estradiol. *Chemosphere* **50**: 429-436.
- Ozato K, Kondoh H, Inohara H, Iwamatsu T, Wakamatsu Y, Okada TS. 1986. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken δ -crystallin gene in medaka embryos. *Cell Differ.* **19**: 237-244.
- Papoulias DM, Noltie DB, Tillitt DE. 2000a. An in vivo model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinylestradiol. *Aquat. Toxicol.* **48**: 37-50.
- Papoulias DM, Noltie DB, Tillitt DE. 2000b. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mar. Environ. Res.* **50**: 181-184.
- Paul PB, Matsuda M, Lau EL, Suzuki A, Sakai F, Kobayashi T, Nagahama Y. 2006. Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**: 815-819.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- Punnamoottil B, Herrmann C, Pascual-Anaya J, D'Aniello S, Garcia-Fernández J, Akalin A, Becker TS, Rinkwitz S. 2010. Cis-regulatory characterization of sequence conservation surrounding the Hox4 genes. *Dev. Biol.* **340**: 269-282.
- Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**: 275-285.
- Rudel RA, Melly SJ, Geno PW, Sun G, Brody JG. 1998. Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 861-869.
- Satoh N. 1974. An ultrastructural study of sex differentiation in the teleost, *Oryzias latipes*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **32**: 195-215.
- Satoh N and Egami N. 1972. Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *J. Embryo Exp. Morphol.* **28**: 385-395.
- Scholz S and Gutzeit HO. 2000. 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* **50**: 363-373.
- Schweinfurth H, Lange R, Miklautz H, Schauer G. 1997. Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol. In: Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, I.f.W.M. (Ed.), Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser. *Oldenbourg, München & Wien* **50**: 39-54.
- Seki M, Yokota H, Maeda M, Kobayashi K. 2005. Fish full life-cycle testing for 17 β -estradiol on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 1259-1266.
- Seki M, Yokota H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2003. Effect of 4-nonylphenol and 4-tert octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 1507-1516.
- Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2004. Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 774-781.
- Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda N, Tadokoro H, Kobayashi K. 2002. Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka, *Oryzias latipes*. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 1692-1698.
- Shibata N and Hamaguchi S. 1988. Evidence for the

- sexual biopotentiality of spermatogonia in the fish, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* **245**: 71-77.
- Shimasaki Y, Kitano T, Oshima Y, Inoue S, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. 2003 Tributyltin causes masculinization in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**: 141-144.
- Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, Nagahama Y, Hamaguchi S. 2000. The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* **42**: 317-326.
- Shiraishi E, Yoshinaga N, Miura T, Yokoi H, Wakamatsu Y, Abe S, Kitano T. 2008. Müllerian Inhibiting Substance Is Required for Germ Cell Proliferation during Early Gonadal Differentiation in Medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* **149**: 1813-1819.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischau AM, Lovell BR, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240-244.
- Stone R. 1994. Environmental estrogens stir debate. *Science* **265**: 308-310.
- Suzuki A, Nakamoto M, Kato Y, Shibata N. 2005. Effect of Estradiol-17 β on germ cell proliferation and DMY expression during early sexual differentiation of the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* **22**: 791-796.
- Suzuki T, Matsuda R, Saito Y. 1992. Molecular species of tri-n-butyltin compounds in marine products. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 1437-1443.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. 1998. *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* **391**: 761-767.
- Takahashi S, Tanabe S, Kubodera T. 1997. Butyltin residues in deep-sea organisms collected from Suruga Bay, Japan. *Environ. Sci. Tech.* **33**: 3103-3109.
- Talykina MG, Papoulias DM, Allert JA, Izyuov YU, Villalobos SA, Giesy JP, Tillitt DE. 2003. The effect of polychlorinated naphthalenes and tributyltin on the occurrence of aberrant nuclei in erythroid cells of medaka. *Environ. Sci.* **10**: 337-348.
- Tanaka M, Kinoshita M, Kobayashi D, Nagahama Y. 2001. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence extensively in germ cells: A useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 2544-2549.
- Thomas KV, Hurst MR, Matthiessen P, Waldock MJ. 2001. Characterization of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2165-2170.
- Tolls J, Kloepper-Sams P, Sijm D. 1994. Surfactant bioconcentrations—a critical review. *Chemosphere* **29**: 693-717.
- Tsuda T, Takino A, Kojima M, Harada H, Muraki K, Tsuji M. 2000. 4-Nonylphenols and 4-tert-octylphenol in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa. *Chemosphere* **41**: 757-762.
- Ueno T, Yasumasu S, Hayashi S, Iuchi I. 2004. Identification of choriogenin cis-regulatory elements and production of estrogen-inducible, liver-specific transgenic Medaka. *Mech. Dev.* **121**: 803-815.
- Van Aerle R, Nolan M, Jobling S, Christiansen LB, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobiio*) in United Kingdom freshwaters. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2841-2847.
- Veith GD, Macek KJ, Petrocelli SR, Carroll J. 1980. An evaluation of using partition coefficients for organic chemicals in fish. In: Eaton JG, Parrish PR, Hendricks A. (ed) *Aquat. Toxicol. ASTM U.S.A.* 116.
- Vidal VPI, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. 2001. *Sox9* induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics* **28**: 216-217.
- Villalobos A, Kemler K, Meadows J, Giesty JP. 1999. Standard Operation Procedure (SOP) of Fish embryo microinjections.
- Wakamatsu Y, Inoue C, Hayashi H, Mishima N, Sakaizumi M, Ozato K. 2003. Establishment of New Medaka (*Oryzias latipes*) Stocks Carrying Genotypic Sex Markers. *Environ. Sci.* **10**:

291-302

- Wakamatsu Y, Pristiyazhnyuk S, Kinoshita M, Tanaka M, Ozato K. 2001. The see-through medaka: A fish model that is transparent throughout life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 10046-10050.
- Walker M, Zabel E, Ackerman G, Balk L, Wright P, Tillitt D. 1996. Fish egg injection as an alternative exposure route for early life stage toxicity studies: description of two unique methods. In Ostrander GK, ed, *Techniques in Aquatic Toxicology*. Lewis, New York, NY, U.S.A. 41-72.
- Wang S and Hazelriggs. 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila organogenesis*. *Nature* **369**: 400-403.
- Weber LP, Balch GC, Metcalfe CD, Janz DM. 2004. Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 792-797.
- Wilson PJ and Tillitt DE. 1996. Rainbow trout embryotoxicity of a complex contaminant mixture extracted from Lake Michigan lake trout. *Mar. Environ. Res.* **42**: 129-134.
- Woychik RP, Stewart TA, Davis LG, D'Eustachio P, Leder P. 1985. An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. *Nature* **318**: 36-40.
- Yamamoto M. 1963. Electron microscopy of fish development. II. Oocyte-follicle cell relationship and formation of chorion in *Oryzias latipes*. *J. Fac. Sci. Tokyo Univ. IV.* **10**: 123-128.
- Yamamoto T. 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* **23**: 571-594.
- Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 2552-2560.
- Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T, Kobayashi K. 2000. Effect of Bisphenol-A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 1925-1930.
- Zeng Z, Tong SY, Lam SH, Gong Z. 2005. Development of Estrogen-Responsive Transgenic Medaka for Environmental Monitoring of Endocrine Disrupters. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 9001-9008.
- Zillioux EJ, Johnson IC, Kiparissis Y, Metcalfe CD, Wheat JV, Ward SG, Liu H. 2001. The sheepshead minnow as an in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**: 1968-1978.

Acknowledgments

The author would like to thank the following:

Dr. Yuji Oshima¹ for his valuable guidance, kind and solid encouragements and constant concerns throughout this work in completing this dissertation.

Dr. Hironori Ando² and Takeshi Kitano³ for their valuable advices and corrections.

Dr. Tsuneo Honjo⁴, Dr. Nobuyoshi Imada⁵, Dr. Yohei Shimasaki⁶ and Dr. Ik Joon Kang⁷ for their guidance and encouragement in conducting study.

Dr. Kenjiro Ozato⁸, Dr. Yuko Wakamatsu⁹ and Dr. Hisashi Hashimoto¹⁰ for continuous advices and impressive instructions; and to Mrs. Noriko Mishima¹¹ for her technical help and solid supports.

Dr. Masato Kinoshita¹² and Dr. Minoru Tanaka¹³ for their giving helpful advices and valuable suggestions.

Dr. Takashi Yanagawa¹⁴ and Dr. Tetsuji Ohyama¹⁵, for their valuable and helpful advices.

Mr. Tsuruda¹⁶ for his guidance and friendly assistance.

Finally, laboratory members^{11,17} and my family for their dedicated help during my study period.

¹: Associate Professor of Kyushu University

²: Associate Professor of Kyushu University,

³: Associate Professor of Kumamoto University

⁴: Emeritus Professor of Kyushu University,

⁵: Associate Professor of Kyushu University,

⁶: Assistant Professor of Kyushu University,

⁷: Associate Professor of Kyushu University

⁸: Emeritus Professor of Nagoya University,

⁹: Professor of Nagoya University, ¹⁰: Assistant Professor of Nagoya University, ¹¹: Laboratory of

Freshwater Fish Stocks, Nagoya University

⁴: Assistant Professor of Kyoto University,

³: Associate Professor of National Institute for Basic
Biology

¹: Professor of Kurume University, ¹⁵: Oita University

⁶: Technical assistant of Kyushu University

⁷: Laboratory of Marine Environmental Science,

Kyushu University

This work was supported by a grant from the
Research for Millennium Project by the Ministry of
Education, Culture, Sports, Science, and Technology
of Japan.

クルマエビのホワイトスポット病 WSD (white spot disease) の防除対策に関する研究^{*1}

佐藤 純^{*2}

Studies on prevention measure of white spot disease of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*

Jun SATOH

Abstract : WSD (white spot disease), the equivalent of penaeid acute viremia (PAV), has become one of the most serious problems not only in the shrimp farming industry but also in hatchery production in Southeast Asian countries and the Americas. The major infection route of the causative virus (WSSV: white spot syndrome virus= PRDV) is considered to be vertical transmission from spawners to larvae/juveniles via eggs in the seed production process of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Therefore, in order to inhibit vertical transmission, eggs are selected based on PCR (polymerase chain reaction) detection of WSSV from the receptaculum seminis after spawning. In addition, the fertilized eggs are disinfected with povidone iodine (5 mg/l for 5 min). In order to prevent horizontal transmission, larval and juvenile rearing seawater is treated with UV irradiation. Stable production of specific-pathogen-free shrimp was accomplished by these countermeasures for the prevention of WSSV transmission. However, in kuruma shrimp farms, horizontal transmission by cannibalism and waterborne routes is also very important among reared shrimp and cohabiting crustaceans in those environments. Thus, it is still difficult to prevent horizontal infection by WSSV at shrimp farms. Recently, a “quasi-immune response” was founded in kuruma shrimp, wherein naturally survived from WSD were protected against a re-challenge with WSSV. Moreover, we developed oral vaccine with WSSV recombinant proteins, rVP26 and rVP28, meaning that shrimp protection against WSSV-infection was inducible by the oral vaccine with rVPs.

Chapter 1. - In 1996, a hatchery of Japan Sea-Farming Association obtained kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) eggs for seedling culture from wild broodstocks, among which some were found to be white spot syndrome virus (WSSV) infected by PCR test. Eggs were washed once with filtrated seawater and reared in the hatchery. During the culture, those post-larval groups in which WSSV were detected were excluded. Although no WSSV was found in the seedlings prior to the transportation to the nursery by PCR test, WSD occurred among them during the culture in the nursery facilities. In 1997, the hatchery again obtained prawn eggs from wild broodstocks. However, in this year, PCR-check was applied to select non-WSSV infected spawners. Furthermore, eggs were disinfected with iodine before being served for rearing. No WSD infection occurred throughout the culture in the hatchery and the nursery facility in this year. These results strongly suggest that the infec-

2011年5月18日受理 (Received on May18,2011)

^{*1} 北海道大学審査学位論文 (掲載するに際し投稿規定に沿って一部修正した)

^{*2} 増養殖研究所上浦庁舎 〒879-2602 大分県佐伯市上浦大字津井浦 (Kamiura Station, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Kamiura, Saiki,Oita 879-2602, Japan)

tion source of WSD occurred in 1996 originated from spawners.

Chapter 2. - Conditions suitable for disinfection of fertilized eggs of *Marsupenaeus japonicus* using povidone-iodine were investigated. Eggs 10 h after fertilization were exposed to 0, 2.5, 5.0 and 10.0 mg/L of active iodine for 5, 10, 15 and 20 min. Hatching rate showed no significant difference between control and test groups in concentration of 2.5 mg/L of active iodine for 5 to 20 min and 5.0 mg/L for 5 to 15 min. Viable bacterial counts in these conditions decreased by more than 90% when compared with those of control groups. There was no significant difference in the hatching rates of eggs with eight different developmental stages between control and tested groups exposed to 5.0 mg/L of active iodine for 5 min.

Chapter 3. - We compared WSSV infection induction in kuruma shrimp by oral, immersion, and intramuscular injection (IM) exposure methods and evaluated the oral vaccine prepared from the recombinant WSSV proteins rVP26 and rVP28. The 50% lethal doses (LD_{50}) of WSSV by oral, immersion, and IM challenges were $10^{-0.4}$, $10^{-4.4}$, and $10^{-7.7}$ g shrimp⁻¹, respectively, indicating that WSSV infection efficiency by oral challenge was significantly less than the other 2 challenge routes. However, in shrimp farms it is believed that WSSV infection is easily and commonly established by the oral route as a result of cannibalization of WSSV-infected shrimp. Kuruma shrimp vaccinated orally with WSSV rVP26 or rVP28 were challenged with WSSV by oral, immersion, and IM routes to compare protection efficacy. The relative percent survival values were 100% for oral challenge, 70 to 71% for immersion, and 34 to 61% for IM. Thus, the protection against WSSV-infection that was induced in kuruma shrimp by oral vaccination with rVP26 or rVP28 seemed equivalent to that obtained through IM vaccination.

Chapter 4. - The phylaxis against WSSV was also inducible by oral vaccination with recombinant WSSV proteins, rVP26 and rVP28. In the present study, kuruma shrimp orally vaccinated with rVPs were sequentially challenged with WSSV to evaluate onset and duration of phylactic response and booster effect. The phylactic response of shrimp against WSSV-challenge peaked at day 45 after the vaccination with rVP26 (RPS: 100%) and at day 55 with rVP28 (RPS: 93%), and decreased within 10-20 days. The phylaxis against WSSV-challenge was boosted by the secondary vaccination with homologous rVPs, but not by those with heterologous rVPs. Phylactic responses by the secondary vaccination appeared more rapid than those by the primary vaccination. These results demonstrated that the duration of phylaxis induced by oral vaccination with rVPs was relatively short, but could be extended by booster vaccination with homologous rVPs.

Key words: WSD, PAV, kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*, vaccine

目 次

序 論

第1章 種苗生産過程における WSD の発生状況

第2章 ポビドンヨード剤を用いた受精卵消毒の安全性と効果

第3章 WSSV の rVP26 および rVP28 を経口投与したクルマエビの WSSV 攻撃に対する感染防御効果

第4章 WSSV の rVP26 および rVP28 を経口投与したクルマエビの感染防御効果の持続期間、免疫記憶および特異性

総合考察

謝 辞

文 献

序 論

1. クルマエビ漁業

(1) 漁獲量、生産額および種苗放流

クルマエビ科に属するクルマエビ属28種のうちの1種であるクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* は、沿岸から大陸棚にかけての泥底、砂泥底に棲息し、インド・西太平洋に広く分布する体長30cm に達する大型のエビ類である。日本沿岸では本州北部以南に分布し(三宅, 1982), 沿岸漁業の重要な対象種となっている。漁業・養殖業生産統計年報(農林水産省統計部)によると、日本国内におけるクルマエビ漁業の漁獲量は、1970年の1,263トン記録した以降徐々に増加し、1985年にはこれまでの最高となる3,741トンまで達した(Fig. 1)。しかし、近年では1,000トン程度にまで落ち込み、1970年頃の水準にまで減少している。また、イセエビ(*Paralichthys* spp.) とクルマエビを除いたエビ類の集計でも漁獲量は1985年以降全国的に減少傾向にあり(浜崎, 北田, 2005), クルマエビを含めたクルマエビ類における現在の漁獲量は、過去最低レベルにある。この漁獲量の減少原因は、漁獲努力量との関係から見てもクルマエビ資源の再生産過程に問題があると考えるのが妥当であり、漁獲量の安定している瀬

戸内海西部海域の現状を解析することで、クルマエビ資源の変遷が解明され则认为られる(浜崎, 北田, 2005)。

一方、エビ類の人工的な増養殖は、1930年代後半に故藤永元作博士によって完成された(Hudinaga, 1942)。クルマエビの完全養殖技術(の完成)は、日本のみならず、アジア諸国を中心に世界的な発展を見るエビ類の増養殖生産の基礎をなした。また、クルマエビの種苗生産技術の完成は、放流と漁業管理による資源管理漁業への転換期においても、いち早く技術開発に取りかかることを可能にした(橘高ら, 1996)。2006年度の国内における放流用エビ類の種苗生産は、クルマエビ、クマエビ(*Penaeus semisulcatus*)、ヨシエビ(*Metapenaeus ensis*) およびホッカイエビ(*Pandalus kessleri*) の4種で行われ、総生産尾数は2.1億尾、そのうちクルマエビは1.5億尾(74%)を占めた(水産庁・(独)水産総合研究センター・(社)全国豊かな海づくり推進協会, 2008)。また、養殖用としても、クルマエビは6千万尾が生産され、クルマエビ種苗の国内生産数はホタテガイに次いで2番目であり、栽培漁業ならびに養殖漁業対象種として重要である。国内のクルマエビの種苗放流尾数は、1987年に3億3千万尾と過去最高を記録した。旧日本栽培

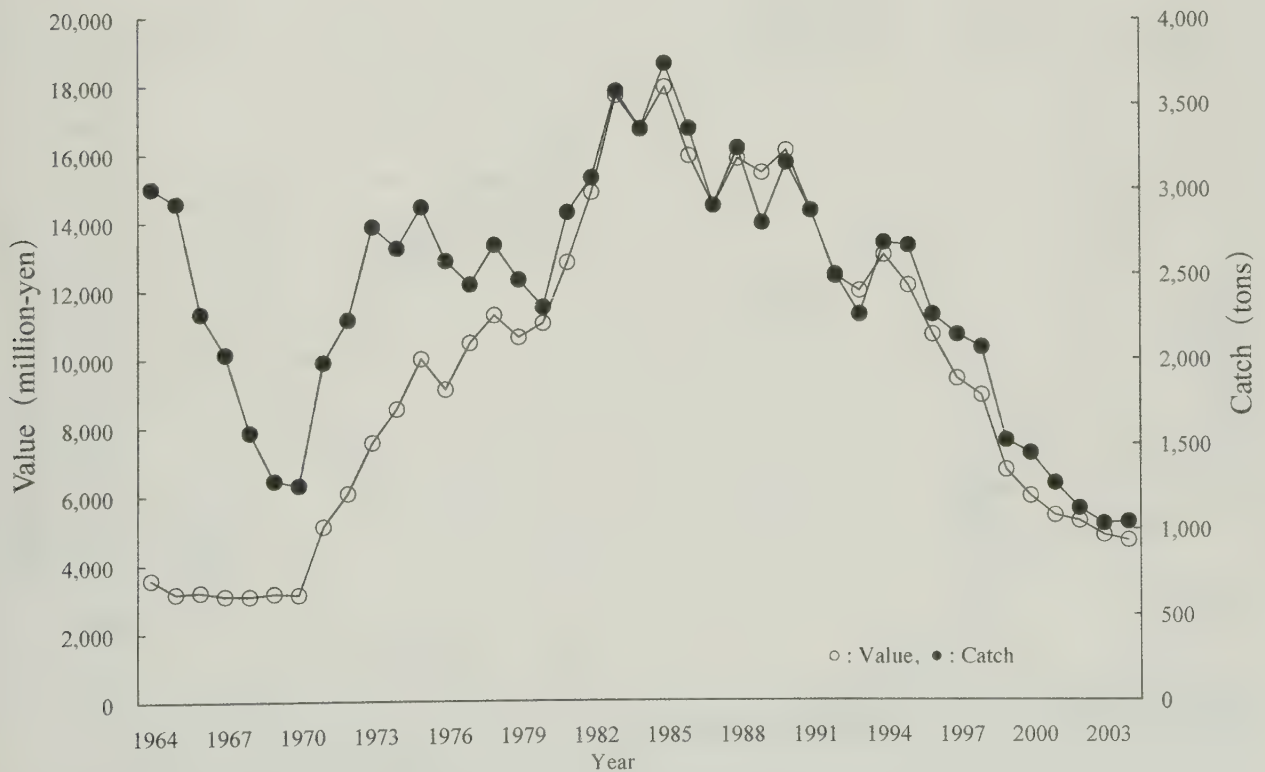


Fig. 1. Fishery production of kuruma prawn in Japan. Data from Ministry of Agriculture Forestry Fisheries (1964-2004).

漁業協会志布志事業場（現増養殖研究所志布志庁舎、以下：志布志庁舎と記す）では、1967年から本種の種苗生産に取り組み、その後関係府県が行うクルマエビ放流事業の支援を目的に2000年まで33年間にわたり、稚エビあるいは種苗の供給を行ってきた。1970年代には、1年間に1億尾前後の種苗を生産できるようになったが、1971年に民間の養殖場のクルマエビ種苗生産過程でバキュロウイルス性中腸腺壊死症（baculoviral mid-gut gland necrosis: BMN）（桃山, 1981; Sano *et al.*, 1981）が発生して以降、クルマエビ種苗の計画的な生産に多大な支障を来した。また、1996年には、志布志庁舎で種苗放流を目的とした中間育成中のクルマエビに急性ウイルス血症（penaeid acute viremia: PAV）が発症し（Inouye *et al.*, 1996）、種苗放流事業の大きな障害となった。1995年以降、種苗期の疾病の流行による放流用種苗数の減少や、放流種苗の平均体長の大形化に伴う尾数減少により、種苗の放流数が急激に減少している（Fig. 2）。種苗放流の効果については、放流効果が高いと考えられる大型種苗を放流するようになったものの、漁獲量は減少しており、クルマエビ資源の変遷は種苗放流と無関係に動いていると考えられている（浜崎, 北田, 2005）。しかし、種苗放流とクルマエビ資源量の増加が直接的に結びつく、高い回収率が得られた事例もあり、地域的な規模ではク

ルマエビの栽培漁業が成立する可能性もある（浜崎, 北田, 2005）。

(2) 養殖生産

養殖生産に目を移すと、国内の生産量は1988年にこれまでの最高値となる3,020トンの生産量を記録した（Fig. 3）。この時の経営体数は159で施設面積は6,035,000m²であった（使用施設当たりの生産量：5.00トン/ha）。平成17年（2005年）の生産量は1,824トンで、経営体数は120、施設面積は4,570,000m²にまで減少している（4.00トン/ha）。1993年の国内におけるPAVの発生以来、単位面積当たりの生産量がピーク時の80%程度にまで減少していることを示しており、PAVあるいはピブリオ病の予防対策の一環として2期作から1期作への転換や放養密度の低下（桃山, 室賀, 2005）などの、セーブした飼育養成を行っている状況が窺える。しかし2000年以降、養殖生産量は漁業生産量を安定して上回っており、国内の重要なクルマエビ供給産業である。なお、以下の記述において、PAVをホワイトスポット病（white spot disease, WSD）と、またPAVの原因ウイルス penaid rod-shaped DNA virus（PRDV）（Inouye *et al.*, 1996）を white spot syndrome virus（WSSV）と記す。

クルマエビ類には、大型の食用種が多く含まれ、ホワイトレグシュリンプ（*Litopenaeus vannamei*）、

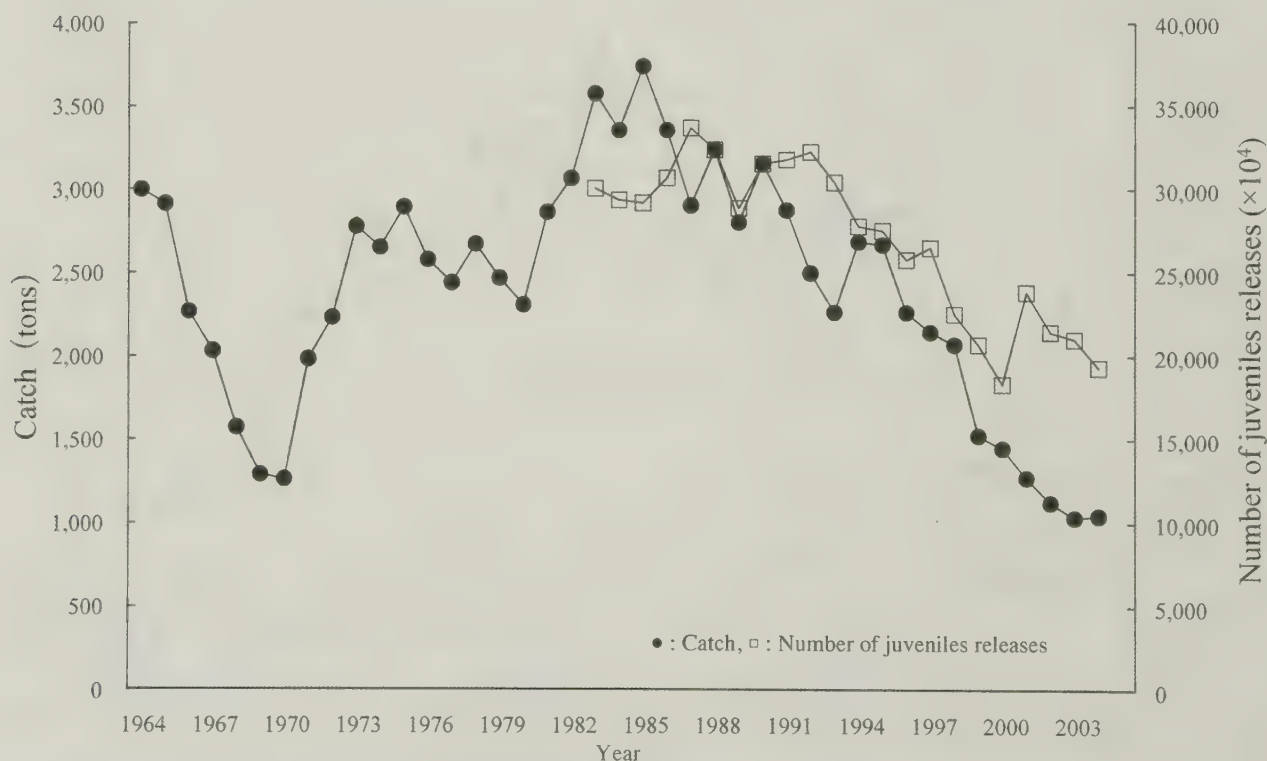


Fig. 2. Fishery production and release project of kuruma prawn in Japan. Data from Ministry of Agriculture Forestry Fisheries (1964-2004).

ウシエビ (*P. monodon*), コウライエビ, Banana prawn (*Melicertus merginatus*), インドエビ (*Fenneropenaeus indicus*), クルマエビ, blue shrimp (*L. stylirostris*) を中心とした 7 種が東南アジア地域で盛んに養殖されている (Fig. 4)。FAO の漁獲統計によ

ると (FAO Fish stat 1970-2006), 1980年以降東南アジアでの養殖生産量が増加するにつれて, 右肩上がり で生産量が増加し続け, 2006年における世界のクルマエビ類養殖生産量は, 3,175,856 トンに達している (Fig. 4)。中国においては, 2001年以降それまでの対象種で

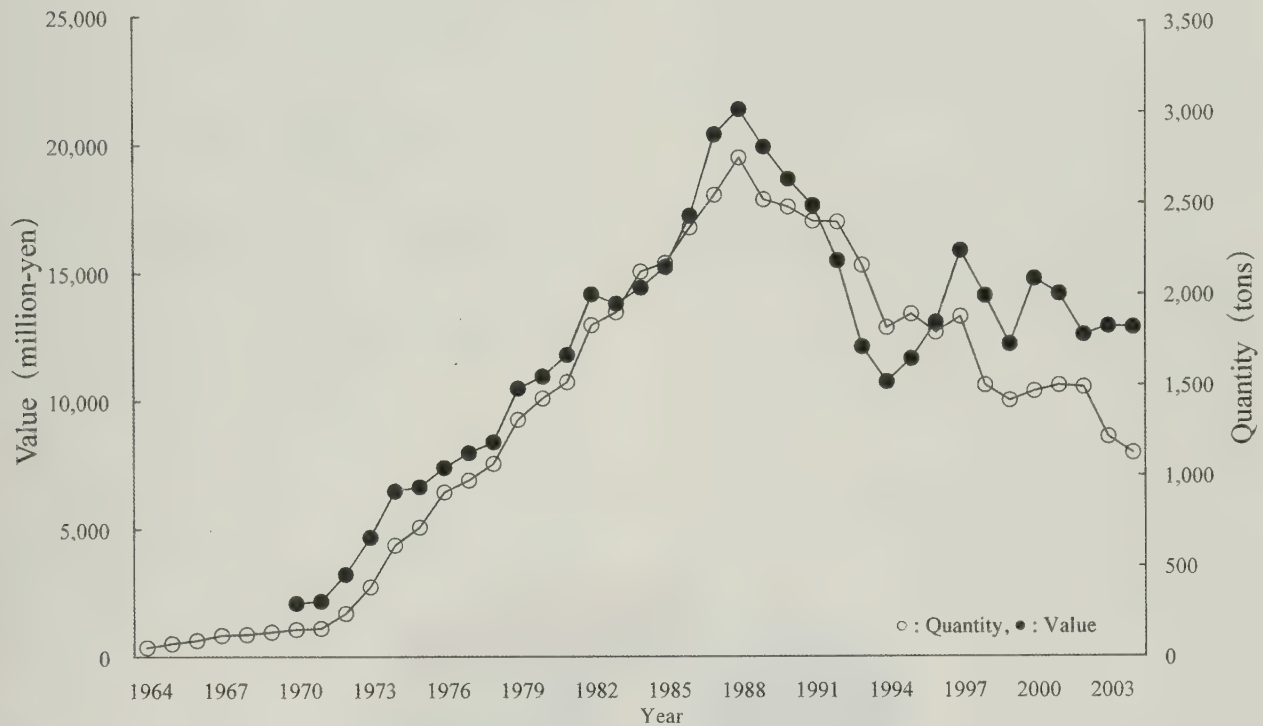


Fig. 3. Aquaculture of kuruma prawn in Japan. Data from Ministry of Agriculture Forestry Fisheries (1964-2004).

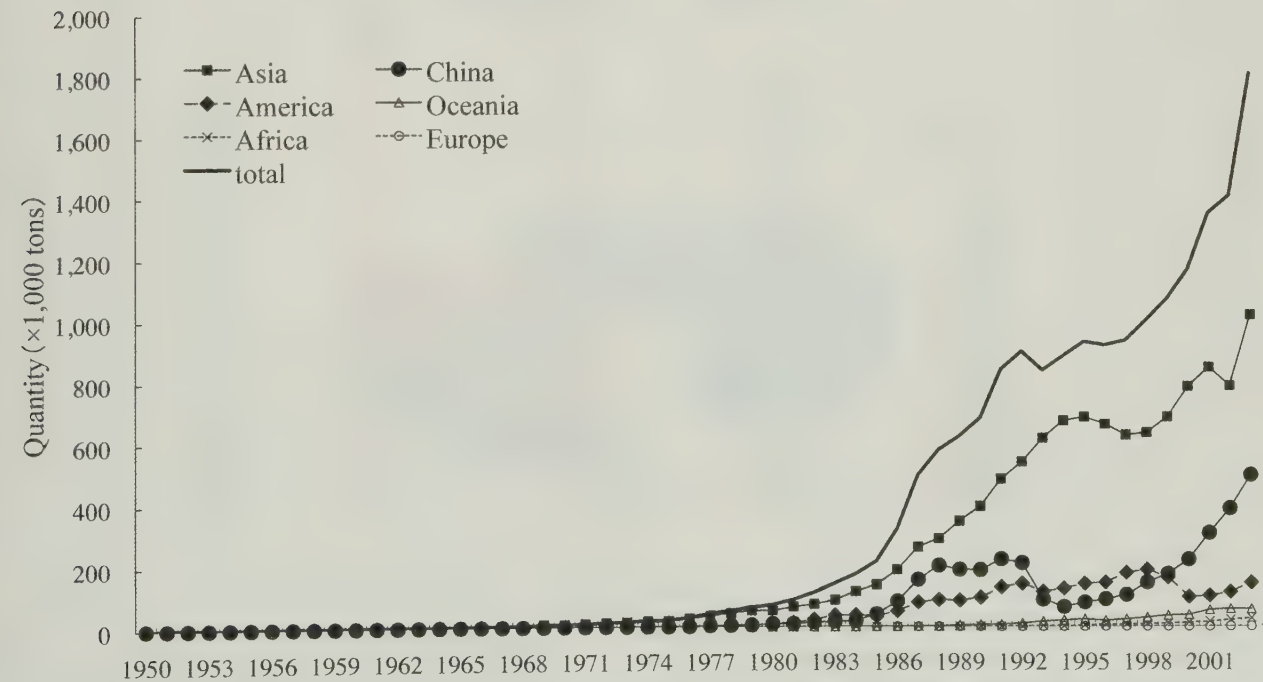


Fig. 4. Production volume of penaeid shrimp aquaculture in region of the world (FAO).

あったコウライエビに加えて、ホワイトレッグシュリンプ (*L. vannamei*) の生産を開始し、2003年以降は、クルマエビ、ウシエビも加わり中国国内の生産量が、2006年は1,242,385トンと2001年の4倍以上に達し、中国一国で総生産量の39%を占めるまで急速に増加した。特にホワイトレッグシュリンプは、その生産量2,136,048トン（総生産量の67.3%）の47%を中国一国で生産しており、世界で最も多い生産量を誇る (Fig. 4, 5)。一方、クルマエビの生産量は2006年に53,098トン記録し、総生産量に占めるクルマエビの生産量が1.7%にまで急激に増加した。なお、2006年のクルマエビの生産量である53,098トンの95.5%は中国で生産された。2003年と2006年の総生産量に占める種類別の生産漁を比較するとホワイトレッグシュリンプの生産量が約3倍となり、総生産量の67%を占めるまでとなった。ホワイトレッグシュリンプは、病害に強く、ウシエビ

に対して約2倍の収容密度で飼育することができ効率的な生産が可能であることから、主要生産国での対象種がウシエビからホワイトレッグシュリンプへと切り替えられたことが生産量増大の背景にある。また、先進国を中心に健康食品としての水産物が注目され、消費されるようになり、世界的に需要の拡大が見られているのと同時に、経済発展めざましい中国での消費拡大による需要の増加が増産の背景にある。

2. クルマエビ類の増養殖における感染症による病害

(1) 国内における病害問題

日本の養殖クルマエビにおける病害問題は、桃山、室賀 (2005) によって、また、種苗生産過程の海産魚介類の疾病発生状況 (1994~1999) は、鴨志田ら (2005) によって詳しくレビューされている。それによると細菌性疾病は、1970年頃のクルマエビ

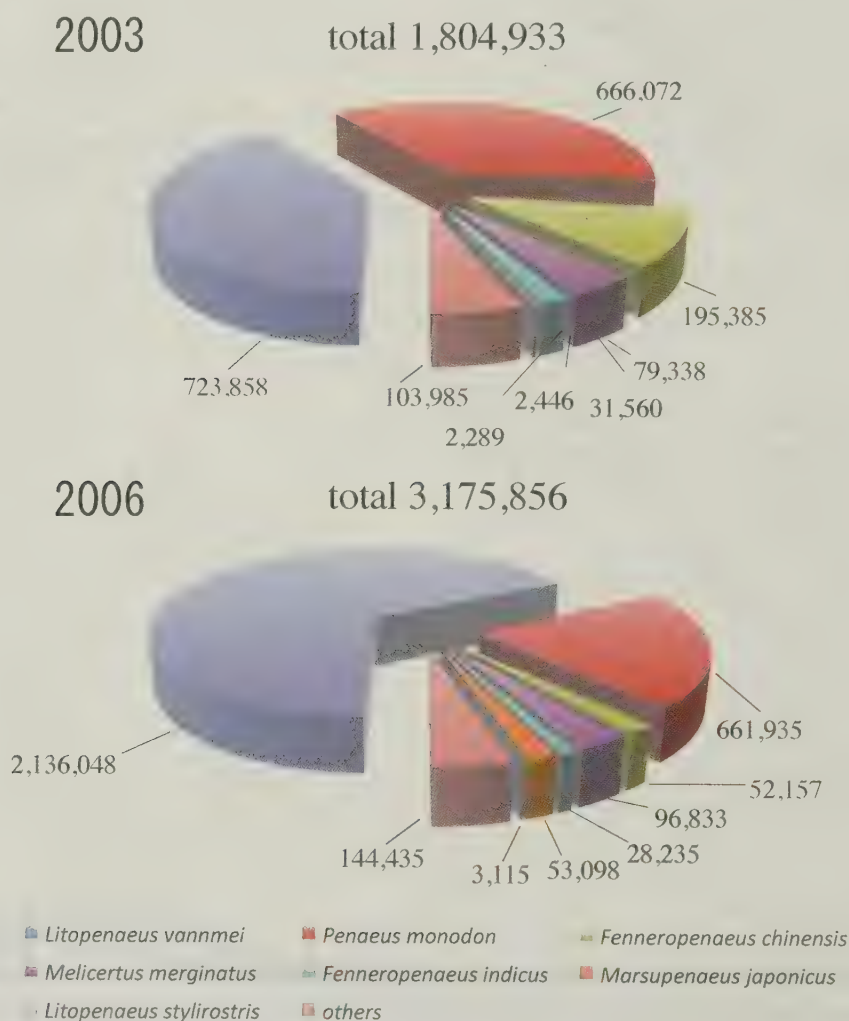


Fig. 5. Production volume of penaeid shrimp aquaculture in the world (FAO).

養殖場において、死亡個体からビブリオ属細菌が分離され、現在においても継続的に発生が確認されている感染症である (Fig. 6, 水産資源保護協会データ) (桃山, 室賀, 2005)。*Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* は、しばしばクルマエビ類養殖生産において分離される細菌であり、種苗生産過程においても *V. harveyi*, *V. splendidus* の分離が報告されている (Lightner, 1996)。1980年代以降、日本のクルマエビ養殖場での被害となったビブリオ病 (高橋ら, 1985; Takahashi *et al.*, 1998) の原因細菌は、*V. penaeicida* とされ (Ishimaru *et al.*, 1995), クルマエビに対して強い病原性を示すことが確認されており (高橋ら, 1985; de la Peña *et al.*, 1993, 1995; 江草ら, 1988), 日本のクルマエビ養殖場に常在する典型的な条件性病原体となっている (魚介類の感染症・寄生虫病, 2004)。2005年には、鹿児島県内のクルマエビ養殖場において高温下 (27℃) で大量死をもたらした新種の原因菌である *V. nigripulchritudo* によるビブリオ病が報告されている (Sakai *et al.*, 2007)。Fig. 6には、各年の全疾病被害額に占める疾病別の被害率を示した。1992年のビブリオ病の被害率は、63.8%と当時の最も深刻な病害であった。1993年に西日本で WSD が

発生して以降、ビブリオ病 (17.1%) の被害率が減少し、WSD (80.2%) に置き換わった様に見えるが、2004年には WSD (9.3%) の被害は減少しビブリオ病 (68.2%) の被害率が再び増加した。2005年はビブリオ病が49.0%, WSD が35.8%で、それらの被害額は同程度となり、クルマエビ病害ではこれら2疾病が常に問題になっている。種苗生産過程においても、1999年に体長20~25mm の個体でビブリオ病の発生事例があり、その発生率 (疾病発生時例数 / 飼育事例数) および死亡率の高さが問題となったことが報告されている (鴨志田ら, 2005)。

真菌病としては、フサリウム症の被害が WSD およびビブリオ病に次いで多く報告されている (Fig. 6)。フサリウム症は、クルマエビの鰓が黒色になるのが特徴で、鰓における呼吸障害と中枢神経や腹行動脈機能障害が起きることと死亡すると考えられている (桃山, 室賀, 2005)。病原菌は *Fusarium solani* (畑井ら, 1978; 畑井, 江草, 1978) である。有効な治療法が知られていないことから、予防的にエビの収穫後の砂床中の *F. solani* を殺菌することが推奨されている (畑井ら, 1978)。一方、種苗生産過程においては、1994年から1999年まで毎年本症の発生が報告され、甲殻類の種苗生産を行う上で大きな問題となっている (鴨志

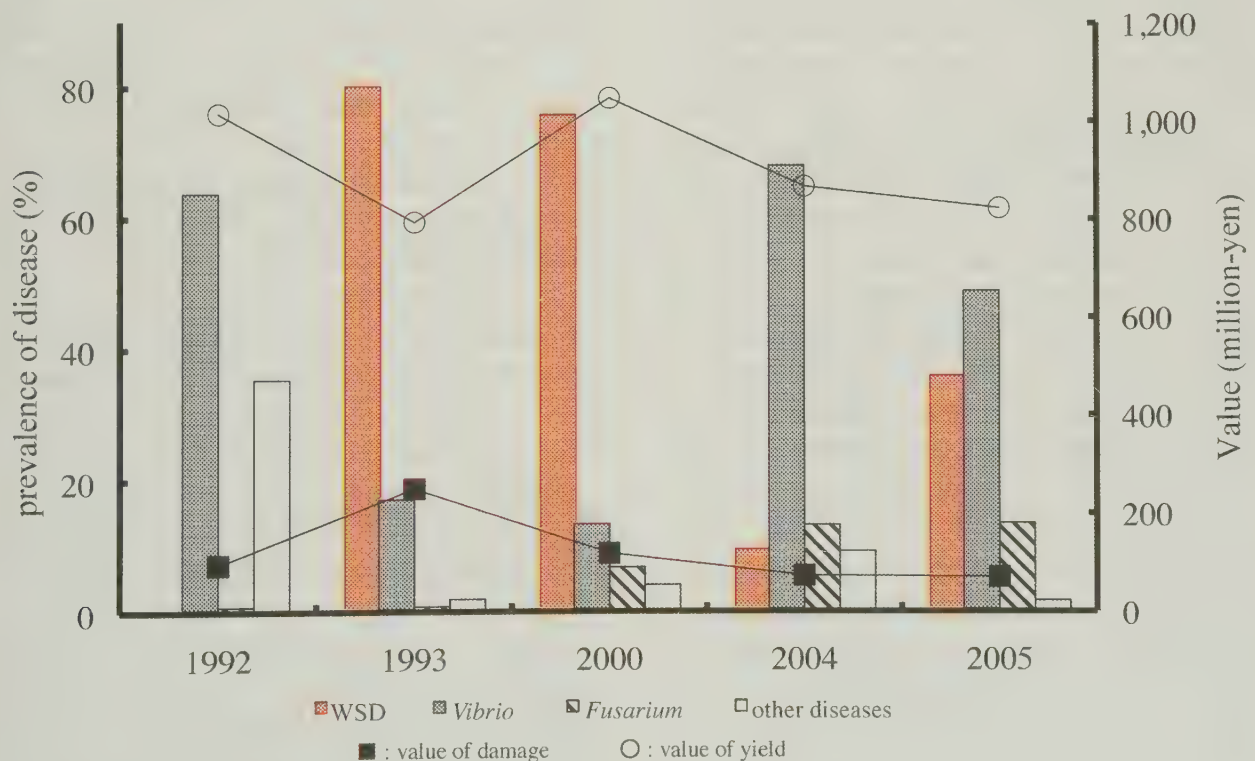


Fig. 6. Occurrence of infectious disease in aquaculture of kuruma shrimp in Japan. Source : Japan Fisheries Resource Conservation Association

田ら, 2005)。フサリウム症の発病時期は、クルマエビ類ではノープリウスからポストラーバ10日齢期にかけて発生し、死亡率は非常に高く、発病すると全滅するケースが多い(鴨志田ら, 2005)。

一方、ウイルス病であるバキュロウイルス性中腸腺壊死症(Baculoviral mid-gut gland necrosis virus: BMN)は、クルマエビのポストラーバ期10日齢前後に発生する。急性で致死性の高いウイルス感染症である。病原体は、Baculoviral mid-gut gland necrosis virus (BMNV)で、エンベロープを有する大型の桿状DNAウイルスである(Sano *et al.*, 1981)。本病は、中腸腺と腸管の一部の白濁を特徴とし、症状は過急性に経過することが多く、感染後数日間で死亡する。本病の対策として、種苗生産過程における受精卵の回収時に親エビの糞などを清浄な海水で洗浄することで垂直感染の防除が可能とされる(Sano and Momoyama, 1992)。ただ現在では、本疾病による病害の報告はほとんどなく(水産資源保護協会データ)、種苗生産過程においても1991年以降の発生報告はない(鴨志田ら, 2005)。

(2) WSD による病害問題

1993年、日本国内のクルマエビの増養殖はWSDにより甚大な被害を受けた。2000年以降、被害のピークは過ぎたものの、2004年には86.7億円の生産額に対して7.3億円の被害が報告され、WSDは現在もおおきな深刻な問題である(Nakano *et al.*, 1994; Momoyama and Muroga, 2005) (Fig. 6)。WSDは、中国から輸入されたクルマエビ種苗を発生源とし、西日本各地のクルマエビ養殖場へ瞬く間に伝播したと考えられている(中野ら, 1994)。本病は、十脚目のエビ・カニ類が感染するウイルス性疾病で、アジアおよび中近東のクルマエビ類養殖でも甚大な被害をもたらしている(Lightner, 1996; Wang *et al.*, 1998; Jory and Dixon, 1999)。WSDはこれまでに東南アジア諸国の養殖クルマエビ、ウシエビ、アカオエビ(*F. penicillatus*)、およびコウライエビなどで発生が報告されている(Table 1)。この他のクルマエビ科に属するクルマエビ(*P. semisulcatus*)、インドエビ(*F. indicus*)、Banana shrimp (*F. merguensis*)、フトミゾエビ(*Melicertus latisulcatus*)、White leg shrimp, White shrimp (*L. setiferus*)、Blue shrimp (*L. stylirostris*)、Northern brown shrimp (*Farfantepenaeus aztecus*)、Northern pink shrimp (*Farfantepenaeus duorarum*)、ヨシエビ、Ginger prawn (*M. monoceros*)、Kadal shrimp (*M. dobsoni*)、Fine shrimp (*M. elegans*)、トラエビ (*M. acclivis*)、アカエビ (*M. barbata*)、キシエビ (*M. dalei*)、サルエビ (*Trachypenaeus cuivirostris*)、

Kiddi shrimp (*Parapenaeopsis styliifera*) の9属22種に感染が確認された (Table 1)。WSSVは、ワタリガニ科およびイセエビ科の数種で、また餌料生物に用いられるアルテミア (*Artemia* sp.) やワムシ (*Brachionus urceus*) でも感染が確認され、さらに昆虫類からもWSSVが検出された事例があり、現在までに12目21科2亜科51属の生物で感染が確認される宿主範囲の広いウイルスである。

WSDは、我が国で報告されたPAVと同一の疾病と考えられている (Takahashi *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000)。前述の如く、PAVの原因ウイルスはPRDVと命名された (Inouye *et al.*, 1996)。本病および原因ウイルスは、国際的にはWSDVあるいはWSSVと呼ばれるが、WSDたる病名の由来となっている罹病個体の外骨格の白点もしくは白斑の症状が、必ずしも本病に特有の症状ではないことから、日本では現在もPAVの病名が一般的に使われている。ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) 第8版 (Fauquet *et al.*, 2005) では、本疾病の病原ウイルスはwhite spot syndrome virus (WSSV)で、ニマウイルス科 (*Nimaviridae*) ウィスポウイルス属 (*Whispovirus*) に分類される (Fauquet *et al.*, 2005)。WSSV粒子は、エンベロープで覆われた卵形あるいは長楕円の桿状で、大きさは幅が120-150 nm、長さが270-290 nmで、粒子の一端に鞭毛様の構造物が付属している (Wongteerasupaya *et al.*, 1995)。ビリオンは、最も外側に脂質の3層からなるエンベロープタンパク質があり、その内側に存在するテグメントタンパク質によって桿状のヌクレオカプシッドが包含されている。WSSVは、約300 kbpの2本鎖DNAをゲノムとし、エンベロープタンパク質由来のVP19およびVP28、テグメントタンパク質由来のVP24およびVP26、ヌクレオカプシッドタンパク質由来のVP15、VP66の計6種類の主要構造タンパク質から構成される (van Hulten *et al.*, 2000 a, b; van Hulten *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002a)。クルマエビのWSD罹病個体は、外骨格の白斑あるいは白点の形成に加え、体色が赤変もしくは褪色化し (Fig. 7)、感染末期にはウイルス血症となる (Momoyama *et al.*, 1995)。病理組織学的には、感染エビの胃の上皮細胞層、結合組織、リンパ様器官、造血組織の中胚葉・外胚葉起源細胞の核の肥大と無構造化が観察される (桃山ら, 1994; 井上ら, 1994)。また最近の研究で、実験感染エビの心臓心筋組織に顕著な壊死が観察され、これがWSD罹病クルマエビの致死病変であるとする報告がある (Miyazaki *et al.*, 2008)。

Table 1. List of WSSV confirmed naturally and/or experimentally infected host species

	Scientific Name	Common Name	Type of Infection*	Reference
Marinewater				
Dendrobranchiata				
Penaeidae				
	<i>Marsuenaenus Marsuenaenus japonicus</i>	Kuruma prawn	N, E	Inouye <i>et al.</i> , 1994; Takahashi <i>et al.</i> , 1994; Lo <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 1998
	<i>Penaeus Penaeus monodon</i>	Giant tiger prawn	N, E	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1995; Chou <i>et al.</i> , 1995; Lo <i>et al.</i> , 1996; Karunasagar <i>et al.</i> , 1997; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>P. semisulcatus</i>	Green tiger prawn	N, E	Maeda <i>et al.</i> , 1998; Momoyama <i>et al.</i> , 1999; Lo <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 1998; Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Vemmeripenaeus Vemmeripenaeus chinensis</i>	Chinese or fleshy prawn	N	Huang <i>et al.</i> , 1995; Flegel, 1997
	<i>F. penicillatus</i>	Red-tailed prawn	N	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Chou <i>et al.</i> , 1995; Wang <i>et al.</i> , 1998
	<i>F. indicus</i>	Indian white prawn	N, E	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997; Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>F. merguensis</i>	Banana prawn	N	Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997
	<i>Melicerius Melicerius latusulcatus</i>	Western king shrimp	E	Momoyama <i>et al.</i> , 1999
	<i>Litopenaeus Litopenaeus vannamei</i>	Whiteleg shrimp	N, E	Lightner <i>et al.</i> , 1998; Solo and Lotz, 2001; Rodriguez <i>et al.</i> , 2003
	<i>L. setiferus</i>	White shrimp	E	Lightner <i>et al.</i> , 1998
	<i>L. stylosiridis</i>	Blue shrimp	E	Tapay <i>et al.</i> , 1997a; Lightner, 1996
	<i>Farfantepenaeus Farfantepenaeus aztecus</i>	Northern brown shrimp	E	Lightner <i>et al.</i> , 1998
	<i>Pa. duorarum</i>	Northern pink shrimp	E	Lightner <i>et al.</i> , 1998
	<i>Metapenaeus Metapenaeus ensis</i>	Grassy back shrimp	N, E	Momoyama <i>et al.</i> , 1997; C. S. Wang <i>et al.</i> , 1997; Lan, Lu and Xu, 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. monoceros</i>		E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>M. dobsoni</i>	Kadal shrimp	N, E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999; Lan, Lu and Xu, 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. elegans</i>		N	Lan, Lu and Xu, 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>M. acclivis</i>	Tora velvet shrimp	N	Momoyama, 2003
	<i>M. barbata</i>	Whiskered velvet shrimp	N	Momoyama, 2003
	<i>M. dalei</i>	Kishi velvet shrimp	N	Momoyama, 2003
	<i>Trachypenaeus Trachypenaeus curvirostris</i>	Southern rough shrimp	E	Chang <i>et al.</i> , 1998a; Y. C. Wang <i>et al.</i> , 1998; Momoyama, 2003
	<i>Parapenaeopsis Parapenaeopsis stylifera</i>	Kiddi shrimp	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	Aristeidae			
	<i>Aristeus Aristeus</i> sp.		N	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	Solenoceridae			
	<i>Solenocera Solenocera crassicornis</i>	Corral mud shrimp	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001
	Sergestidae			
	<i>Acetes Acetes</i> sp.	Krill	E	Supamattaya <i>et al.</i> , 1998
Pleocyemata				
	Alpheoidea			
	<i>Alpheus Alpheus brevicristatus</i>	Snapping shrimp	N	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	<i>A. lobidens</i>	Apping shrimp	N	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	Palaemonidae			
	<i>Palaemon Palaemon adspersus</i>	Balut prawn	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	<i>Pa. styliferus</i>	Grass shrimp	N	Lo <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997
Freshwater				
Pleocyemata				
	Palaemonidae			
	<i>Macrobrachium Macrobrachium rosenbergii</i>	Giant river prawn	N, E	Pramod <i>et al.</i> , 2002; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Lo <i>et al.</i> , 1996; Flegel, 1997; Chang <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 1997; Rajendran <i>et al.</i> , 1999; Hossain <i>et al.</i> , 2001
	<i>Ma. idella</i>	Sunset prawn	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Exopalaemon Exopalaemon orientis</i>	Oriental prawn	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Flegel <i>et al.</i> , 1997; Chang <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 1998
	Astacidae			
	<i>Pacifastacus Pacifastacus leniusculus</i>	Signal crayfish	E	Jiravanichpaisal <i>et al.</i> , 2001
	<i>Astacus Astacus leptodactylus</i>	Turkish crayfish	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	Cambaridae			
	<i>Procambarus Procambarus clarkii</i>	Red swamp crayfish	E	Wang <i>et al.</i> , 1998; Chang <i>et al.</i> , 1998
	<i>Oronectes Oronectes limosus</i>	Striped crayfish	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	Parastacidae			
	<i>Cherax Cherax destructor albidus</i>	Yabby	E	Edgerton, 2004
	<i>C. quadricarinatus</i>	Australian redclaw	E	Shi <i>et al.</i> , 2000
	Pandalidae			
	<i>Heterocarpus Heterocarpus</i> sp.		N	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
Stomatopoda				
	Squilla			
	<i>Squilla Squilla</i> sp.		N, E	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hossain <i>et al.</i> , 2001
Crab				
Pleocyemata				
	Brachyura			
	Calappidae			
	<i>Calappa Calappa philagnus</i>	Boxer crab	E	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Ca. lophos</i>	Box crab	N, E	Flegel, 1997; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	Portunidae			
	<i>Charybdis Charybdis feriata</i>	Coral crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Y. C. Wang <i>et al.</i> , 1998; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cha. natalae</i>	Hairy back crab	N	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Flegel, 1997
	<i>Cha. annulata</i>	Swimming crab	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Cha. cruciata</i>	Red sea crab	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
	<i>Portunus Portunus pelagicus</i>	Blue swimming crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1996, 1997a; Supamattaya <i>et al.</i> , 1998; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Po. sanguinolentus</i>	Threespot swimming crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1997a; Chang <i>et al.</i> , 1998; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Po. trauherculanus</i>	Swimming crab	N	Maeda <i>et al.</i> , 1998; Momoyama <i>et al.</i> , 1999

	<i>Scylla Scylla serrata</i>	Mangrove or mud crab	N, E	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Kanchanaphum <i>et al.</i> , 1998; Supamattaya <i>et al.</i> , 1998; Rajendran <i>et al.</i> , 1999; Cheng <i>et al.</i> , 2000; Chakraborty <i>et al.</i> , 2002; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>S. tranquebarica</i>	Mangrove or mud crab	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Podophthalmus Podophthalmus vigil</i>	Long-eye swimming crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Thalamita Thalamita danae</i>	Swimming crab	N, E	Flegel, 1997; Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Liocarcinus Liocarcinus depurator</i>	Harbour crab	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
	<i>L. puer</i>	Velvet swimming crab	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
Grapsidae				
	<i>Helice Helice tridens</i>	Shore crab	N	Lo <i>et al.</i> , 1996a; Maeda <i>et al.</i> , 1998
	<i>Metapograpsus Metapograpsus messor</i>	Purple climber crab	N, E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Sesarma Sesarma sp.</i>	Marsh crab	N, E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Grapsus Grapsus albolineatus</i>	Rock crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Varurinae				
	<i>Pseudograpsus Pseudograpsus intermedius</i>	Mosaic crab	N	Chakraborty <i>et al.</i> , 2002
Majidae				
	<i>Doclea Doclea hybrida</i>		E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Xantidae				
	<i>Halimede Halimede ochiodes</i>	Hairy crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
	<i>Liagore Liagore rubromaculata</i>		E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Matutidae				
	<i>Matula Matula miersii</i>	Moon crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Dorippidae				
	<i>Paradorippe Paradorippe granulata</i>		E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Parthenopidae				
	<i>Parthenope Parthenope prensor</i>	Elbow crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Leucosiidae				
	<i>Philyra Philyra syndactyla</i>	Purse crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Canceridae				
	<i>Cancer Cancer pagurus</i>	Edible or rock crab	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
Ocypodoidea				
Ocypodidae				
	<i>Macrophthalmus Macrophthalmus sulcatus</i>	Ghost/fiddler crab	N	Hossain <i>et al.</i> , 2001
	<i>Uca Uca pugnator</i>	Calico fiddler crab	E	Kanchanaphum <i>et al.</i> , 1998
	<i>Gelasimus mariomis nitidus</i> (synonym of <i>Uca vomeris</i>)		N	Hossain <i>et al.</i> , 2001
Gecarcinucoidea				
Parathelphusidae				
	<i>Somanniathelphusa Somanniathelphusa sp.</i>	Black rise crab	E	Flegel, 1997
Anomura				
Paguroidea				
Lithodidae				
	<i>Lithodes Lithodes maja</i>	Deep sea king crab	E	Hameed <i>et al.</i> , 2003
Lobster				
Palinura				
Palinuroidea				
Palinuridae				
	<i>Panilurus Panilurus ornatus</i>	Tropical rock spiny lobster	E	Flegel., 1997; Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pan. versicolor</i>	Painted spiny lobster	E	Chang <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Pan. longipes</i>	Longlegged spiny lobster	E	Flegel., 1997
	<i>Pan. penicillatus</i>	Transpacific spiny lobster	E	Chang <i>et al.</i> , 1998a
	<i>Pan. homarus</i>	Scalloped spiny lobster	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pan. polyphagus</i>	Mud spiny lobster	E	Rajendran <i>et al.</i> , 1999
Scyllaridae				
Scyllarinae				
	<i>Scyllarus Scyllarus arcus</i>	Small European locust lobster	E	Corbel <i>et al.</i> , 2001
Anostraca				
Artemiidae				
	<i>Artemia Artemia sp.</i>		E	Li <i>et al.</i> , 2003
Other organisms				
Copepoda		copepod	N	Lo <i>et al.</i> , 1996a
Ploima				
Brachionidae				
	<i>Brachionus Brachionus urceus</i>	Rotifer	N, E	Yan <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2006; Yan <i>et al.</i> , 2007
Insect				
Coleoptera				
Chrysomelidae				
	<i>Mantura Mantura sp.</i>		N	Flegel, 1997
Diptera				
Muscomorpha				
	<i>Ephydridae Ephydridae sp.</i>	Shore fly	N	Lo <i>et al.</i> , 1996b

12orders 21families 2subfamilies 51genuses
Type of infection*: N: natural infection, E: experimentally infected

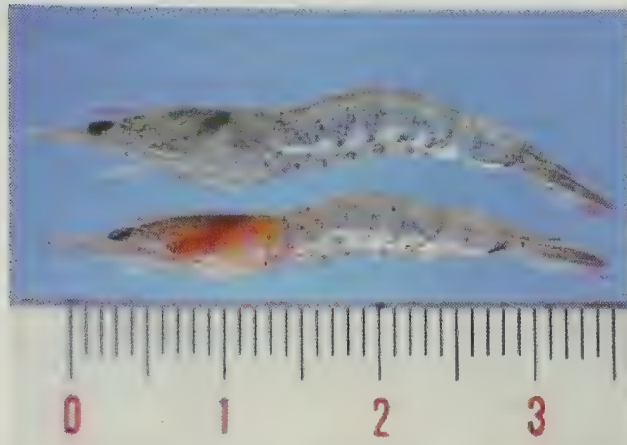


Fig. 7. WSSV infected kuruma shrimp. upper ; health, lower ; infected

クルマエビの種苗生産施設では、1995年に初めてWSDの発生が報告され、1999年までは毎年報告されている（鴨志田ら、2005）。本疾病の発生は、ヨシエビにおいても報告があり、近年でもクルマエビおよびヨシエビの種苗生産機関の10%程度でWSSVの検出あるいはWSDの発生が認められ、計画的な種苗放流事業の妨げとなっている。クルマエビの種苗生産過程におけるWSSVの主たる感染経路は、垂直伝播であることから（Mushiake *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 1999）、その防除対策としてWSSVフリー親エビの選別、ヨード剤を用いた受精卵の消毒および飼育水の殺菌が重要である（Mushiake *et al.*, 1998, 1999; Satoh *et al.*, 1999, 2001; 佐藤ら2003）。これらの対策により、陸上施設等を用いた種苗生産過程でのWSSV防除対策はほぼ確立されたが、中間育成場や養殖施設においては、飼育環境中に生息する甲殻類からの、あるいは飼育海水を介したWSSVの水平伝播が起こる危険性があり、未だ解決されていない。事実、Maeda *et al.* (1998)、Momoyama *et al.*, (2003) は養殖場に生息する甲殻類からWSSVが検出されることを、またWu *et al.* (2001) は共食いによる水平感染がWSSVの重要な伝播経路であることを報告しており、養殖場や放流用種苗の中間育成場における水平感染対策も重要な課題である。

(3) WSDの診断あるいはWSSVの検出方法

WSD罹病エビの血リンパを用いた診断法は、暗視野顕微鏡下で観察すると約0.5 μm の多数の微粒子が認められることや、胃上皮層の感染細胞の核が10～15 μm の円形あるいは楕円形の輪郭明瞭で無構造の白色物体として観察されることから簡便な方法として報告されている（Momoyama *et al.*, 1995）（Table

2）。原因ウイルスの検出には、特異的プライマーを用いてWSSVの遺伝子を検出するPCR法（Takahashi *et al.*, 1996; 木村ら、1996; Lo *et al.*, 1996b）が開発され、病エビの診断をはじめ、キャリアーや親エビからのウイルス遺伝子の検出法として用いられている。その他、外国ではin situ hybridization（Durand *et al.*, 1996, Wongteerasupaya *et al.*, 1996）、蛍光抗体法（Lo *et al.*, 1997; Zhan *et al.*, 1999; Poulos *et al.*, 2001）、dot blot hybridization（Chang *et al.*, 1998）、dot immunoblot assay（Poulos *et al.*, 2001; You *et al.*, 2002）、ウェスタンブロット法（Poulos *et al.*, 2001）、ELISA法（Chen *et al.*, 2002b）、初代培養細胞を用いたウイルス分離法も報告されている（Tapay *et al.*, 1997）。従来のPCR法（木村ら、1996）では、nested PCR反応が終了するまでに約5時間を要し、この間に産卵水槽毎に管理している卵の発生が進み、種苗生産水槽に収容するまでの間にふ化への悪影響が懸念された。そのため、虫明ら（1999学会発表）^{*4}は、木村ら（1996）の開発したPCR法を若干改良し、PCR法の熱変性、アニーリング及び伸長の3つのステップの反応のうち、アニーリングのステップを省略する2ステップPCR法（シャトルPCR法）により反応時間の短縮を図った。その結果、従来法（木村ら、1996）と2ステップPCR法を用いてWSSVの検出感度を比較しても、全く遜色のない結果が得られるとともに、nested PCRまでの反応時間を半分の約2.5時間に短縮することに成功した。現在も多くのクルマエビ種苗生産機関では、WSSV陽性親エビを選別するためにPCR法による検査が行われているが、PCR法による検出系が報告（木村ら、1996）されてから既に10年以上が経過し、最近では簡便で高効率、高精製度の核

Table 2. Diagnostic methods for WSD Diagnostic methods Reference

Diagnostic methods	Reference
Dark-field microscopic observation	Momoyama <i>et al.</i> , 1995
PCR	Takahashi <i>et al.</i> , 1996、Kimura <i>et al.</i> , 1996、Lo <i>et al.</i> , 1996b
In situ hybridization	Durand <i>et al.</i> , 1996、Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1996
Immunofluorescence assays	Lo <i>et al.</i> , 1997、Zhan <i>et al.</i> , 1999、Poulos <i>et al.</i> , 2001
Dot blot hybridization	Chang <i>et al.</i> , 1998
Dot immunoblot assay	Poulos <i>et al.</i> , 2001、You <i>et al.</i> , 2002
Western blot techniques	Poulos <i>et al.</i> , 2001
ELISA	Chen <i>et al.</i> , 2002b
Primary cell culture	Tapay <i>et al.</i> , 1997b

酸抽出キットや高速 PCR 機器あるいは高温耐性に優れた DNA 合成酵素などが市販されている。最新の情報を踏まえつつ適材適所に改良された検査手法の導入を図る必要がある。また、高感度な検出法であることから、感染性がないウイルスを検出することも考えられることからその判定は慎重に行わなければならないし、確定診断を行う場合は病理組織学的検査も必要であろう。

3. クルマエビ類の生体防御能を利用した WSSV 防除

クルマエビの種苗生産過程においては WSSV フリー産卵親魚の選別、ポピドンヨードによる受精卵消毒、ならびに殺菌海水での飼育により中間育成に至るまでの WSSV の垂直伝播による感染防除対策が構築され (Mushiake *et al.*, 1999 ; Satoh *et al.*, 2001 ; 佐藤ら, 2003), 主に放流を目的とする種苗生産機関において継続的に実施されている (Fig. 8)。中間育成および養殖過程では、WSSV の重要な感染経路とされる環境生物の捕食、共食いあるいは水系感染による水平感染 (Maeda *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2001 ; Momoyama *et al.*, 2003) の防止対策がない。ウイルスフリーの放流種苗に対して、水平伝播対策を施すことは主にコストの面から、現実的でないため対策が行われていない

が、逆に養殖生産においては、WSSV 検査に多大な労力とコストを要するウイルスフリーの種苗の生産には力点を置かず、養殖過程に実施可能な効果的で効率的な水平伝播対策の構築が望まれている。

甲殻類の生体防御機構については、産業上重要なエビ類の増養殖生産過程で病害が多発することから、その解明・研究が注目され始めている。高橋ら (1995) の総説では、無脊椎動物に病原微生物の死菌あるいは生菌を投与することで誘導される生体防御は、病原体特異抗体の産生を行わないので、免疫賦活効果として考えることが適当とし、抗体を持たない無脊椎動物のワクチンに関する開発・研究はほとんど行われなかったとしている。しかし、高橋ら (1995) の総説から10年以上が経過した現在、クルマエビ類をはじめ多くの甲殻類の生体防御機構に関する新たな研究が次々と報告されている。その一つに、WSSV 感染耐過エビ類は再感染に対し抵抗性を獲得すること (Venegas *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002), またクルマエビにおいて実験的に誘導された WSSV に対する感染防御効果はビブリオ感染に対して無効であったこと、さらに WSSV 感染耐過クルマエビの血リンパ液には、WSSV を特異的に中和する活性が認められることが明らかになり (Wu, 2003), エビ類の感染防御機構にも一種の免疫様現象が存在する可能性が示唆された。さら

*4 虫明敬一, 清水 健, 森広一郎, 有元 操, 佐藤 純, 1999. 親エビ受精囊の PRDV の存在量と PAV 発生との関係, 平成11年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, 40.

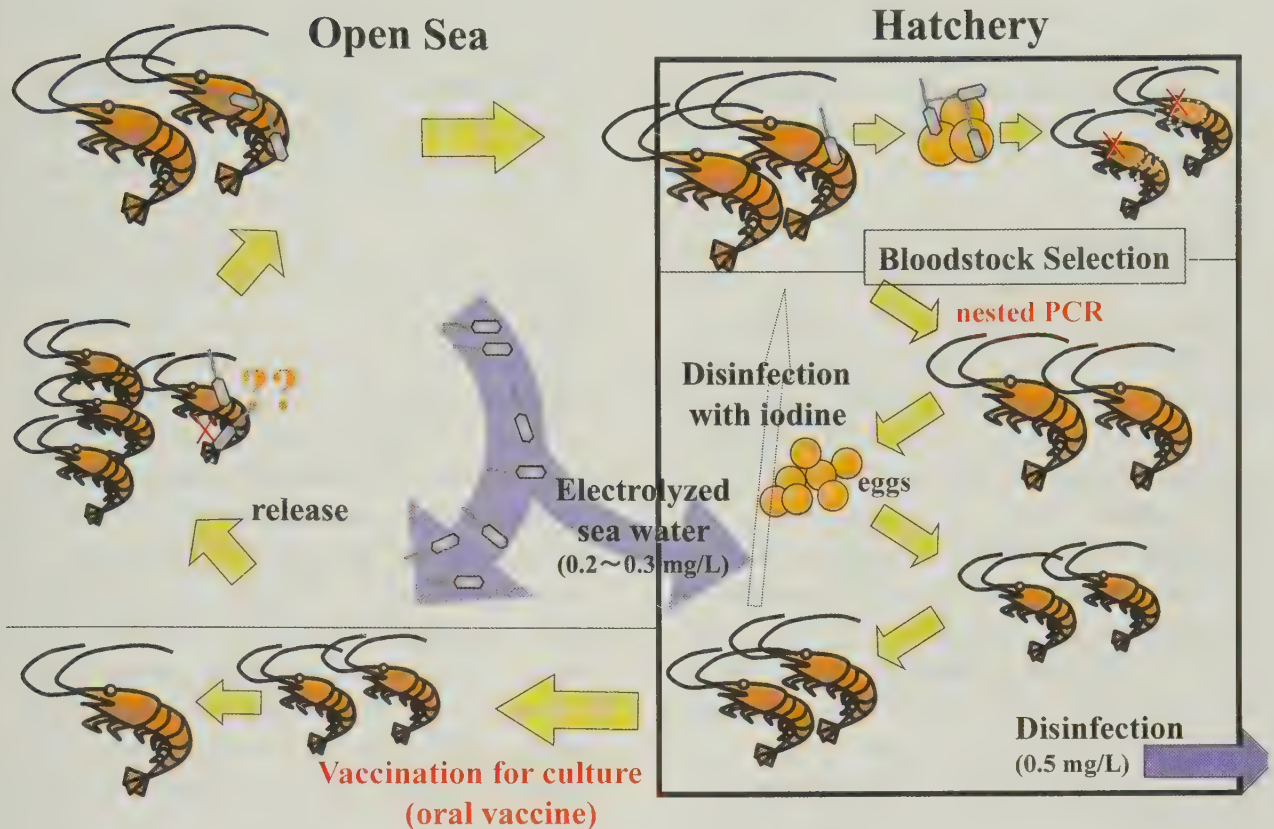


Fig. 8. Disease control in shrimp hatchery.

に、組換え大腸菌で発現した WSSV 構造タンパク質 (recombinant viral protein, rVP) をクルマエビ、ウシエビ、White leg shrimp *L. vannamei*, アメリカザリガニに筋肉接種あるいは経口投与することで、自然感染耐過エビと同様に WSSV に対する防御効果が誘導されることが確認されている (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004a, b 2006; Vaseenharan *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2006, 2007)。ワクチン様効果とも言うべき現象の防除技術へ応用が期待されている。

本研究では、クルマエビにおける WSSV の防除対策を確立することを目的に、第 1 章において種苗生産過程における WSD の発生状況について報告した。第 2 章においては、クルマエビ受精卵のポビドンヨード剤による消毒の安全性と効果について調査を行った。第 3 章では、WSSV の攻撃量の把握と発現タンパク質の経口投与による WSSV 防御効果に関する試験を行った。第 4 章では、WSSV 発現タンパク質の経口投与によって誘導される WSSV に対する防御効果の発現時期、持続期間および追加投与効果に関する試験を行った。

第 1 章 種苗生産過程における WSD の発生状況

1. 目的

国内の種苗生産機関 (主として中間育成期) での WSD の発生は、クルマエビ以外では、これまでヨシエビでの発生事例 (Momoyama *et al.*, 1997) が報告されているに過ぎない。本章では、1996 年および 1997 年の志布志庁舎におけるクルマエビ種苗生産過程 (中間育成も含む) での WSSV の検出および WSD の発生状況について述べる。なお、クルマエビの幼生期の名称は、我が国では伝統的にノープリウス、ゾエア、ミシスおよびポストラーバという通称が使われているが、これらの通称は十脚甲殻類の国際的な名称とは必ずしも一致しない (倉田, 1986; 本尾, 1988)。国際的な名称に従えば、各ステージの呼称は、ノープリウス (1~6 令) = ノープリウス, ゾエア (7~9 令) = プロトゾエアあるいはゾエア, ミシス (10~13 令) = ミシスあるいはゾエア, ポストラーバ (13~14 令) = メガロバ, (15 令以降) = 稚エビとのように修正される。しかし、我が国の種苗生産現場では、いまだにこれらの通称が慣用されている現状から、本研究にお

いてはこれらの名称を用いることとした。その際、ポ
ストラーバ期の記載方法は Hudinaga (1942) の報告
した記載とは異なり、通例ポストラーバ期に達した段
階からの日齢で表記する方法が使用されているため、
それに準じた

2. 材料および方法

(1) 親クルマエビの購入と採卵

1996年および1997年の志布志庁舎における種苗生産
用天然親クルマエビ（以下 親エビ）の購入から採卵
までの概要を Table 3に示した。1996年の種苗生産で
は5月24日から9月17日にかけて、九州および四国の
各沿岸海域で漁獲された親エビを6,639尾購入した。
また、1997年は、4月11日から8月7日にかけて、九
州沿岸海域で漁獲された親エビ2,748尾を購入した。
いずれも、購入地において目視による透視観察により
卵巣が発達した親エビを選別した。

1996年の種苗生産では、砂濾過海水の入った水槽(容
量 1.6 kL)に300～600 尾の親エビを収容し、志布志
庁舎まで輸送したが、1997年は、輸送中の親エビ間の
接触の機会を少なくする目的で、紫外線殺菌処理（日
本フォトサイエンス製 NPL-10, 22）海水を入れた発
泡スチロール製容器（10 L）に、1～7尾ずつ収容し
輸送した。輸送時間は、購入地と志布志庁舎の距離の
関係で、1996年は3.5～10 時間を1997年は3.5～6 時間
を要した。1996年の輸送中の水温は、20～25℃を保っ

たが、1997年は、輸送中の産卵を抑制するため15℃前
後とした。

まず、1996年は、志布志庁舎に到着した後、購入し
たすべての親エビを角型コンクリート製産卵水槽（25
kL）に収容し、飼育水温24～29℃で種苗生産に必要
な卵数に応じて1～3日間産卵させた。親エビ検査に
ついては、産卵後の一部の個体の胃上皮（約50 μg）
を個体別に採取し、後述する PCR による WSSV 検査
用試料とした。

翌1997年は、生検法（宮島・松本, 1996）による成
熟個体の判別を行うため、デイスポーザブル・シリン
ジ（容量 3 mL：注射針 18 G）で親エビ卵巣の一部を
採取して検鏡し、卵巣卵の表面に表層胞が形成された
個体（前成熟期および成熟期）を選別した。なお、採
取した卵巣の一部（約100 μg）は、個体別に PCR に
よる WSSV 検査に供した。選別された成熟個体は、
ウイルス検査結果が判明するまで、エアレーションを
施した小型水槽(10 L)に個別に収容し、白色ランプ(東
芝ライフテック製 D400) 3 基を全水槽を照らすよう
に配置し、光照射と飼育水温の冷却（15℃）により小
型水槽内での産卵を抑制した。卵巣検査で WSSV 陰
性と判定された個体5～12尾を1グループとして産卵
水槽（0.5 kL）に収容した。その際、産卵水槽には紫
外線殺菌処理海水（30,000 μW・sec / cm² 照射）を
給水し、水温を24～28℃として1～3日間産卵させ
た。

Table 3. Outline of wild broodstocks of kuruma prawn employed for seed production and countermeasures for WSD at Shibushi Station of JASFA in 1996 and 1997

Year	1996	1997
Broodstocks		
Captured area	Coastal waters of Kyushu and Shikoku	Coast of Kyushu
Captured date	May 24th ~ September 17th	Apr. 11 ~ Aug. 7
Mean body weight (range) (g)	91.6 (64.4-125.6)	70.6(61.0~93.0)*
Transportation of spawners		
Tank volume (l)	1600	10
Number of tank	1	20~108
No. of spawners per tank	300~600	1~7
time required (h)	3.5~10.0	3.5~6.0
Selection of spawners	Not done	Done*1
Disinfection of eggs	Not done	Done*2
Rearing sea water	Filtrated sea water	UV-treated sea water

*1 Selection of spawners was based on the detection of WSSV from ovary by 2 step PCR.

*2 Eggs were dipped into iodophor (5 mg/ l) for 5 min.

水槽内に産出された卵の採集は、ネット（目合 100 μm ）でろ過する方式を採用した。採集した卵は、1996年は清浄な濾過海水を用いて卵洗浄を行った。1997年は紫外線処理海水で洗浄した後にヨード剤による消毒（有効濃度 5 mg / L, 5 分間）（Mushiake *et al.*, 1999）を行った。

(2) 種苗生産

採卵後、洗浄あるいは消毒した卵は、屋外コンクリート製飼育水槽（150～2,500 kL）に収容し、水温24～28℃でふ化させた。ふ化時のノープリウスの収容密度は、0.4～10.8 万尾 / kLであった。飼育餌料には、テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele*, アルテミアノープリウス *Artemia salina* および市販の人工配合飼料を用いた。飼育水の換水はミシス期以降に開始し、換水率は種苗の成長に応じて増加させ、最終的には1日200%とした。なお、1996年の飼育用水には砂濾過海水を、また1997年には紫外線処理海水を用いた。飼育期間中の水温は加温により23℃を維持したが、夏期は25℃以上に上昇するため、自然水温とした。

種苗の検査は、1996年は卵（whole 50 μg を1検体とし、5検体：以下 whole 50 μg $\times$ 5と記す）、ノープリウス（whole 50 μg $\times$ 5）、ゾエア（whole 50 μg $\times$ 5）、ミシス（whole 50 μg $\times$ 5）、ポストラバ1日齢期（P1, ふ化後11日目；whole 5 尾を1検体とし10検体：以下 whole 5尾 $\times$ 10）、P5（P4）（ふ化後15日目、whole 5 尾 $\times$ 10）および配付直前の P20（P9）（ふ化後30日目、whole 1尾 $\times$ 30）を検査した。なお、括弧内に、幼生の形態観察により Hudinaga (1942) の分類に基づく幼生の名称を併記した。1997年の種苗生産では、P5まで前年と同様に行い、以後 P30（P11）（ふ化後 40日目）までは5日間隔で検査（whole 1尾 $\times$ 30）し、最終的には中間育成場へ輸送する各ロットについて輸送2日前（P25～P30；P10～P11）にそれぞれ検査（1尾の頭胸部を1検体とし30検体：以下 頭胸部1尾 $\times$ 30）を行った。なお、中間育成場に輸送する際、種苗の一部は中間育成が終了するまで事業場で引き続き飼育し、その間5日毎にPCRによるウイルス検査（頭胸部1尾 $\times$ 30）を行った。

(3) 中間育成

飼育水槽で生産された種苗は、関係各機関に配付し、中間育成に供した。中間育成過程の飼育施設は、コンクリート水槽、キャンパス水槽、築堤式あるいは囲い網式で、飼育水温は何れも25.7～28.2℃であった。

(4) PCR による WSSV 遺伝子の検出

親エビおよび種苗からの鋳型 DNA の抽出は、水産庁が提示したマニュアル（1996）に準じて行った。抽出した核酸は、TE（10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM

EDTA）100 μL に溶解した。WSSV の検出は、親エビおよび飼育種苗から抽出した DNA（1 μL ）を鋳型とし、木村ら（1996）の方法を一部改変した2 step PCR（nested PCR）により行った。すなわち、PCR 反応液の全量を25 μL とし、DNA ポリメラーゼ Takara Ex Taq（タカラバイオ）を用い、PCR プライマーとして1st-step PCR では P1（5'-ATC ATG GCT GCT TCA CAG AC-3'）および P2（5'-GGC TGG AGA GGA CAA GAC AT-3'）を、2nd-step PCR では、P3（5'-TCT TCA TCA GAT GCT ACT GC-3'）および P4（5'-TAA CGC TAT CCA GTA TCA CG-3'）を用い、DNA サマルサイクラー（9600, パーキンエルマー）で標的遺伝子を増幅した。増幅反応の条件は、72℃・10分間および95℃・6分間の反応後、95℃・1分間、57℃・1分30秒間、72℃・1分間を1サイクルとし25あるいは30サイクルの後、72℃・5分間の反応を行った。増幅サイクル数は親エビ検査では30サイクルとし、種苗の検査では水産庁のマニュアル（1996）に準じて25サイクルとした。

3. 結 果

(1) WSD の発生状況

1996年の種苗生産においては、計9回の飼育事例中4例（飼育事例 No. 6～9）で、中間育成配付前の種苗からWSSVが検出され、飼育を中止した（Table 4）。これらの飼育過程で、WSSVが最初に検出された種苗のステージは、卵からP10の発育段階で、その時の飼育水温は22.1～29.4℃であった。一方、種苗生産事例 No. 1～5では、P20まではいずれの発育段階でもWSSV陰性で、WSDの発生も認められなかった。しかし、事例 No. 1～5の種苗を中間育成場に輸送した後、一部のエビを志布志庁舎で継続飼育していたところ、事例 No. 3および5のP51およびP29の一部がPCRによりWSSV陽性と判定された。これと符合するように、事例 No. 3および5の種苗を用いた中間育成8事例全てでWSDが発生した（Table 4）。中間育成場においては、種苗を輸送した1日後から18日後の発育ステージ（P27～P55）でWSDが発生し、大量死に至った。瀕死の個体には、体色の赤変、褪色および甲皮に白点認められ、約10日間での累積死亡率は50～100%に達した。種苗生産事例 No. 5の種苗を用いた中間育成場での死亡個体では、70%の個体が1 step PCRでもWSSV陽性と判定された。

種苗生産に用いた親エビについて、産卵終了後、一部の個体の胃上皮をWSSV検査に供した結果、7月下旬以降に購入した親エビからWSSVが検出された（Table 4）。これらの親エビを用いた種苗生産（No. 5

Table 4. Detection of WSSV from spawners and juveniles in seed production at Shibushi Station of JASFA and occurrence of WSD in nursery culture in 1996

Trial No.	Spawners		Detection of WSSV in seed production* ² (eggs to P20)	Occurrence of WSD	
	Captured date	PCR test* ¹		in seed production	in nursery culture
1	May 24, 25	-	-	-	- (0/4)* ³
2	Jun. 25	-	-	-	- (0/1)
3	Jul. 12	-	-* ⁴ (P51)* ⁴	-	+ (3/3)
4	Jul. 16, 17	-	-	-	- (0/3)
5	Jul. 24	+	-* ⁴ (P29)* ⁴	-	+ (5/5)
6	Sep. 3	+	+	+	Not done
7	Sep. 4	+	+	+	Not done
8	Sep. 12	+	+	+	Not done
9	Sep. 17	-	+	+	Not done

*¹ Detection of WSSV from stomach cuticular epidermis of spawners after spawning by 2 step PCR.

*² Detection of WSSV from larvae and postlarvae sampled during the seed production. The stage of prawn in parenthesis represents the developmental stage when WSSV was first detected by 2 step PCR.

*³ (Number of cases WSD recorded/conducted).

*⁴ PRDV was detected later from juveniles which were reared in the hatchery after their siblings were transferred to nursery grounds.

Table 5. Detection of WSSV from spawners and juveniles in seed production at Shibushi Station of JASFA and occurrence of WSD in nursery culture in 1997

Trial No.	Spawners		Detection of WSSV from postlarvae* ¹	Occurrence of WSD	
	Captured date	PCR test		in seed production	in nursery culture
1	Apr. 11	-	-	-	- (0/1)* ²
2	May 12, 13	-	-	-	- (0/1)
3	May 16	-	-	-	- (0/4)
4	May 17	-	-	-	- (0/1)
5	May 21-23	-	-	-	- (0/2)
6	Jun. 11, 12	-	-	-	- (0/3)
7	Jul. 17	-	-	-	- (0/3)
8	Jul. 19	-	-	-	- (0/1)
9	Jul. 22	-	-	-	- (0/1)

*¹ Detection of WSSV from postlarvae just before transportation to nursery culture ground.

*² (Number of cases WSD recorded/conducted).

～8) では、結果的にはいずれの種苗からも WSSV が検出され、親エビにおける WSSV の存在と種苗からの WSSV の検出結果とがよく一致した。ただし、種苗生産事例 No. 9 に用いた親エビの胃上皮からは WSSV は検出されなかったにもかかわらず、その後の種苗生産過程で、種苗 (P5) から WSSV が検出された。

一方、1997年には4月および5月に搬入した親エ

ビの卵巣から WSSV が検出されたものの、これらの PCR 陽性個体を排除した陰性個体のみから得た卵を種苗生産に用いた結果、9回の種苗生産事例および17回の中間育成事例のいずれにおいても WSSV は検出されず、WSD の発生も認められなかった (Table 5)。なお、旧日裁協上浦事業場 (現水産総合研究センター増養殖研究所上浦庁舎、以下上浦庁舎と記す) で1997年7月と8月に搬入した PCR 陽性個体を含む親エビ

から採卵して得たノープリウスを飼育試験に供したところ、2回の事例とも種苗（P8、P22）から WSSV が検出され、その後 P35 および P55 において WSD が発生し、大量死が認められた。

(2) 採卵時期と種苗からの WSSV の検出

親エビの選別および卵の消毒を行わなかった1996年の志布志庁舎（Table 4）における親エビからの採卵時期と種苗からの WSSV 検出時期との関係を Table 6にまとめた。5月および6月に搬入した親エビからの卵を用いて種苗生産を開始した事例では、種苗のいずれの発育ステージにおいても WSSV は検出されなかった。しかし、7月に購入した親エビから得た卵で種苗生産を行った事例では、6事例中2事例の種苗（P29およびP51）が WSSV 陽性となった。また、8月および9月に開始した場合には、すべての事例で WSSV 陽性となった。特に、9月開始の事例では P20 以前に WSSV 陽性となり、親エビからの採卵時期が遅くなるほど種苗からの WSSV の検出率が高くなるとともに、WSSV が検出される種苗の発育ステージが早まる傾向がみられた。

4. 考 察

WSSV の防除対策として、採卵に使用する親エビの選別とヨード剤による卵消毒を行わなかった1996年は、5～7月採卵分の種苗において、中間育成場に配付する前の P20 までは WSD による死亡はみられなかったものの、配付後の中間育成段階において、一部（No. 3、5）の種苗で WSD が発生した。9月以降に得られた卵を用いた事例では、配付前の種苗から WSSV が検出されたため生産を中止した。また、採卵後に調べた親エビの胃上皮からは、7月下旬以降

になると WSSV が検出される傾向を示した。一方、1997年においては、天然親エビの調査結果（虫明ら、1998）から親エビの WSSV 陽性率が比較的低いと考えられる4月から種苗生産を開始し、親エビ選別と卵消毒による防除対策を講じた結果、種苗生産および中間育成のいずれの段階においても WSD は発生しなかった。また、上浦庁舎で行った飼育試験で、WSSV 陽性個体が混入した親エビから得られた種苗において WSSV が検出され、WSD が発生した（Mushiake *et al.*, 1999）。これらの結果から、クルマエビ種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は、親エビからの垂直伝播であると考えられた。

1996年の種苗生産事例において、産卵後の一部の親エビ胃上皮を検査した結果 WSSV 陰性と判定されたにもかかわらず、それらの親エビから得た種苗から WSSV が検出された事例が2事例（飼育事例 No. 3と9）あった。これは、親エビの検査部位と検査尾数に問題があったためと考えられる。この点について、その後の研究により雌親エビの場合には卵巣（虫明ら、1998）もしくは受精嚢（交尾により雄から獲得した精子を貯蔵しておく小嚢）（Mushiake *et al.*, 1999）から効率的に WSSV が検出されることが判明した。したがって、胃上皮のみの PCR 検査結果に基づく親エビの選別法は、WSSV キャリアーの排除には不十分であることが明らかになった。検査尾数に関しては、大型水槽を用いて種苗を量産する場合、まとまった量の卵を確保するために300～600尾の親エビを使用していることから、産卵に供した親エビの一部を検査するだけでは、親エビ全体の WSSV の保有状況を把握できるとは考え難い。以上のことから、種苗生産に用いるすべての親エビの卵巣および受精嚢について、PCR

Table 6. Season of egg collection and first appearance of WSSV at each developmental stage of kuruma prawn in seed production at Shibushi and Tamano Stations of JASFA in 1996

Collection of eggs	Seed production			First appearance of WSSV		
	Number of trials		Detection rate (%)	before P20	P21 ~ P40	after P41
	Conducted	PCR positive*1				
May	1	0	0	0*2	0	0
June	2	0	0	0	0	0
July	6	2	33.3	0	1	1
August	2	2	100	0	2	0
September	4	4	100	3	1	0

*1 Number of trials where WSSV was detected by 2-step PCR in postlarvae during seed production process.
*2 Number of trials where WSSV was detected at each developmental stage.

Table 7. Detection of WSSV from juveniles of kuruma prawn in seed production at Shibushi station of JASFA and occurrence of WSD in nursery culture in 1996 and 1997

Year	Selection of spawners* ¹	Disinfection treatment of eggs by iodophor	Presence of WSSV in juveniles	Outbreak of WSD in nursery culture
1996	Not done	Not done	6/9* ²	8/16* ³
1997	Done	Done	0/9	0/17

*1 Selection based on the detection of WSSV from ovary by 2 step PCR.

*2 Number of cases in WSSV positive in juveniles of prawn/conducted.

*3 Number of cases in occurrence of WSD/conducted.

法による WSSV 検査を実施する必要があることが示された。

中間育成場での WSD の発生率は、7 月以降に採卵し飼育された種苗において高い傾向にあった。これは、虫明ら (1998) が明らかにしたように、天然親エビでは夏期に漁獲される親エビほど WSSV 陽性率が高いことに起因すると考えられる。したがって、表 6 の結果から推察しても、親エビの WSSV 陽性率が比較的低いと考えられる 4 月から 6 月の間に得た卵を種苗生産に利用することも、WSSV の防除には有効な方法であることが示された。以上の結果を基に防除対策を実施した 1997 年の種苗生産では、幼生からの WSSV の検出および中間育成場での WSD の発生は一切認められず (Table 7)、本法による親エビ選別が、WSSV 防除対策に極めて有効であることが確認された。

第 2 章 ポビドンヨード剤を用いた受精卵消毒の安全性と効果

1. 目的

種苗生産過程における本疾病の防除対策の一つとして、親エビからの垂直感染を防止するためにヨード剤による受精卵消毒が栽培漁業センターなどで広く実施されている (Mushiake *et al.*, 1999; 佐藤ら, 2003)。また、ウシエビにおいては、WSSV が卵巣卵内に存在すると卵の発育が阻害され、垂直伝播が起らないとされているが、卵およびふ化幼生については洗浄または消毒を実施することが有効な垂直伝播の防除になる (Lo *et al.*, 1997)。WSSV は、有効ヨウ素濃度 2.5 mg/L 海水で 10 分間 (中野ら, 1998)、2.5 mg/L 以上で 0.2 分以内、1.0 mg/L で 2 分以内 (桃山, 谷村, 2004) に不活化されるとの報告がある。受精卵の消毒による垂直感染防除効果を得るために、病原体の消毒剤に対する感受性の検討に加え、受精卵の消毒処理

に対する耐性を明らかにすることが必要である。さらに、種苗生産施設において卵消毒を行う場合には、ふ化率に大きな影響を及ぼさない範囲で消毒する必要がある。ポビドンヨード剤が海産魚介類の受精卵消毒剤としては未承認であるため、水産総合研究センターでは、その効能拡大を最終的な目的とし受精卵の消毒条件の把握に関する実験を実施している。本報告では、ポビドンヨードがクルマエビ受精卵に影響を及ぼす濃度と処理時間を卵発生段階毎に検討するとともに、受精卵の一般生菌数の変化からヨード剤の殺菌効果についても検討した。

2. 材料と方法

(1) 有効ヨウ素濃度と消毒時間が安全性と消毒効果に与える影響

ポビドンヨード剤として水産用イソジン液 (明治製菓) を用い、上浦庁舎および旧日裁協五島栽培漁業センター (現西海区水産研究所五島庁舎、以下五島庁舎と記す) の濾過海水で所定濃度に希釈して消毒液 (以下、ヨード液) を作製した。

有効ヨウ素濃度と消毒時間が受精卵のふ化に与える影響と消毒効果を把握するための指標として用いられている生菌数の減少効果 (笠井ら, 2001) について試験を行った。なお、種苗生産における卵消毒実施時期を考慮して、水温 22℃ で受精後 6～9 時間経過し、胚に環状帯が形成された以降のステージの受精卵を用いた。

1) 採卵親エビ

採卵には捕獲直後の天然クルマエビ (以下、親エビ) を用い、異なる 3 個体の親エビから得られた受精卵を供試した。それぞれの親エビの全長、体重および産出卵の受精率は、個体 A : 24.9 cm, 104.0 g で 95.7%、個体 B : 21.2 cm, 113.4 g では 98.2%、個体 C : 24.5 cm, 107.2 g では 97.5% であった。親エビは、個体毎

に500 L ポリエチレン水槽に収容し、微通気、無注水で産卵させた。水温は、加温装置を用い22℃に維持した。産卵の確認された水槽から卵を集め、75 L のプラスチック容器（三甲）に0.02 g/L (2,000個 /L) となるように収容した。

2) ヨード剤の濃度と消毒時間

ヨード液は、有効ヨウ素濃度2.5, 5.0および10.0 mg/L の3濃度とし、それぞれの濃度で5, 10, 15および20分間消毒した。消毒は、目的のステージに達した各受精卵0.6 g を所定濃度に希釈したヨード液1.8 L に浸漬して行った。所定時間に達した段階で、直径6 cm, 深さ2 cm, 目合い200 μ m のネット（ニッタル 7xx-200）で取りあげた。生菌数の測定に供試するため0.1 g の受精卵を取り、1 mL の2%ペプトン水でヨードの反応を止めた。また、受精卵2 mg をろ過海水の流水中（600 mL/min）に置いたネットに収容して3分間洗浄し、新しいシャーレ（直径9 cm, 深さ1.5 cm, 水量13 mL）に移して22℃の室内でふ化させた。対照区は、ろ過海水に所定時間浸漬した（Fig. 9）。

3) ふ化幼生の観察

ふ化を確認後、ノープリウス2期（藤永 1935）に

到達した段階でルゴール液により固定し、未ふ化生残卵（発生は正常に進んでいるがふ化していない受精卵）、死卵、正常ノープリウス、死亡ノープリウスおよび異常ノープリウスを実体顕微鏡下で計数し、ふ化率（正常ノープリウス数 / 総数 $\times$ 100）を算出した。

4) 生菌数の測定

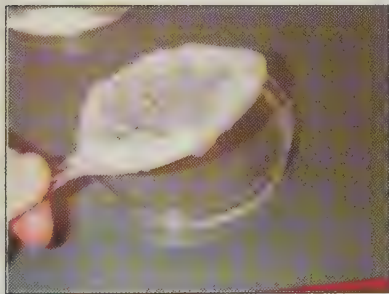
生菌数は、滅菌ペプトン水で洗浄した受精卵に9倍量の滅菌人工海水を加えて磨砕し、10倍希釈液列を作製し、海水平板培地（ポリペプトン5 g, 肉エキス1 g, プロテオースペプトン1 g, 寒天15 g, 酵母エキス1 g, Herbst's 人工海水750 mL, 蒸留水250 mL, pH 7.8）に塗抹後、25℃で5日間培養し、コロニー数を測定した。

(2) 受精卵の発育段階と消毒の安全性

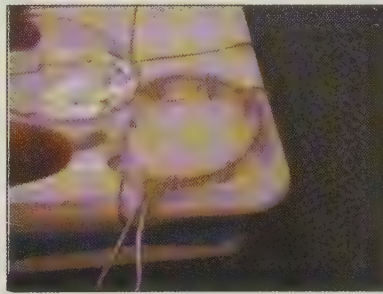
卵発育段階ごとの受精卵のヨード剤に対する感受性試験を、前記試験と同様に捕獲直後の親エビから自然産卵によって得た受精卵を用いて実施した。

1) 採卵親エビ

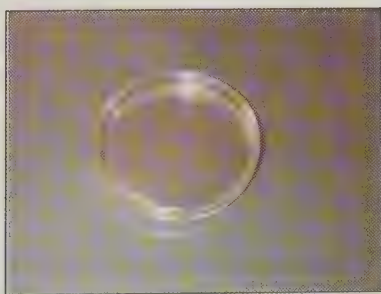
供試した3個体の親エビの全長、体重および産出卵の受精率は、個体D：22.2 cm, 90.0 gが92.3%, 個体E：20.2 cm, 88.0 gが92.0%および個体F：20.8 cm, 77.0 gでは90.8%であった。



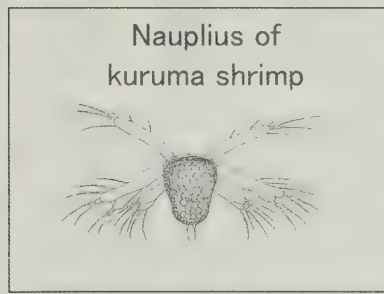
Disinfection



Rinse with fresh sea water (600mL/min.)



Incubation for hatching



Nauplius of kuruma shrimp
Observation of hatching

$$\text{Normal hatching rate(\%)} = \frac{\text{number of normal nauplius}}{\text{number of tested eggs}} \times 100$$

Fig. 9. Procedure of povidone-iodine treatment in experiment of disinfection eggs of kuruma shrimp.

2) 採卵の各ステージでの消毒試験

産卵方法は、前述と同様に行った。産卵が確認された水槽から直ちに卵を採取し、卵管理水槽として用いた75 Lのプラスチック容器に0.03 g/Lとなるよう収容し、死卵などの異常卵の取り除きは行わなかった。消毒試験には、卵管理水槽から90%以上が所定のステージに達したことを確認した受精卵の2 mgを直径6 cm、深さ2 cm、目合い200 μ mのネット（ニッタル7xx-200）に取り、有効ヨウ素濃度5 mg/Lのヨード液6 mLの入ったシャーレ（直径9 cm、深さ1.5 cm）に収容し、5分間の処理を行った。対照区として、ろ過海水を用いて同じ処理を行う区および未処理区を設けた。5分後、受精卵を流水のろ過海水中（600 mL/分）に置いたネットに収容して3分間洗浄し、新しいシャーレ（前出）に移して22℃の室内でふ化させた。受精卵の発育段階は、2細胞期、128細胞期、胚に環状帯出現期、第1触角の始痕の形成期、附属肢の分叉肢の形成期、外肢および内肢の形成期、卵内ノープリウス初期および卵内ノープリウス後期の8期とした（藤永

1935）。なお、試験水温は、加温装置を用いて21.8～22.4℃に保った。

3. 結果および考察

(1) 有効ヨウ素濃度と消毒時間が卵消毒と受精卵の発育に及ぼす影響

有効ヨウ素濃度2.5 mg/Lで5～20分間消毒した場合および5.0 mg/Lで5、10および15分間消毒した場合のふ化率は、対照区との間に有意差は認められなかった（ $p < 0.05$; Fisher's PLSDによる多重比較検定, Fig. 10）。種苗生産を成功させるためには経験的に50%以上のふ化率の受精卵を供試することが望まれることから、いずれの濃度においても5分間以内に消毒を終える必要があると考えられた。有効ヨウ素濃度5.0 mg/Lで20分および10.0 mg/Lで5～20分間消毒した場合は、ふ化率が対照区と比較して有意（ $p < 0.01$ または $p < 0.05$ ）に低下した（Fig. 10）。このときすべての実験区の生菌数は約1桁減少し、対照と比較して有意に減少した（ $p < 0.01$; Fisher's PLSDによる多

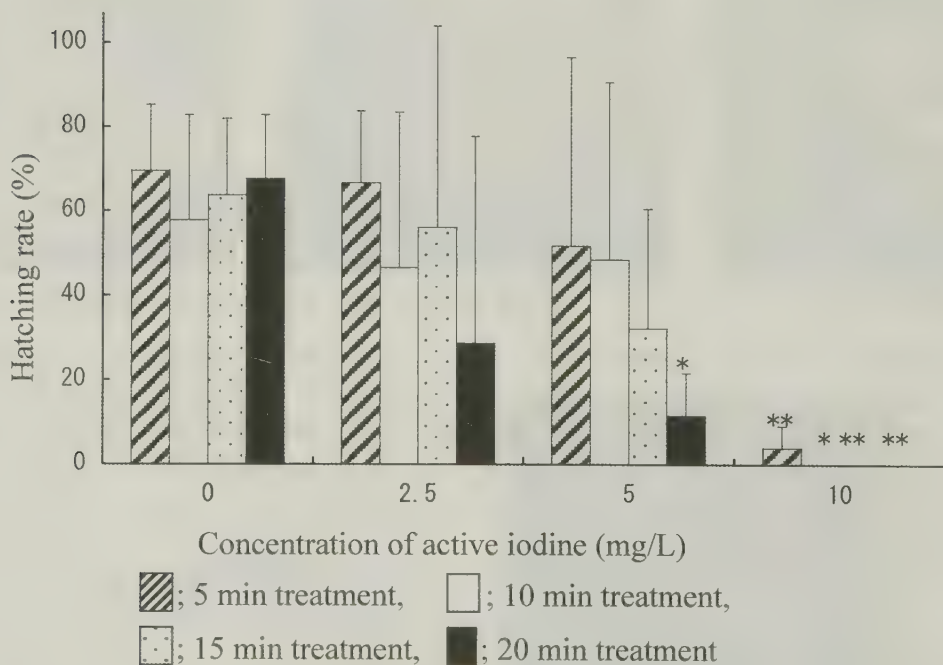


Fig. 10. Sensitiveness of kuruma prawn eggs (1st antenna is formed above the 2nd appendage stage) on treatment of povidon-iodine. Experiments in triplicate were conducted for 5, 10, 15 and 20 min. Values are means and standard deviations. Significant differences from the control values are indicated by * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.01$).

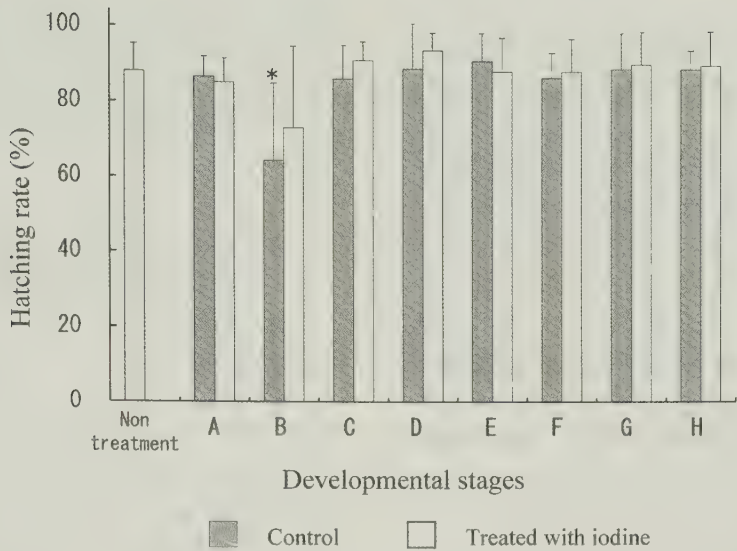


Fig. 11. Viable bacterial counts of iodine treated eggs (means and standard deviations). Significant differences from the control values are indicated by**($p<0.01$).

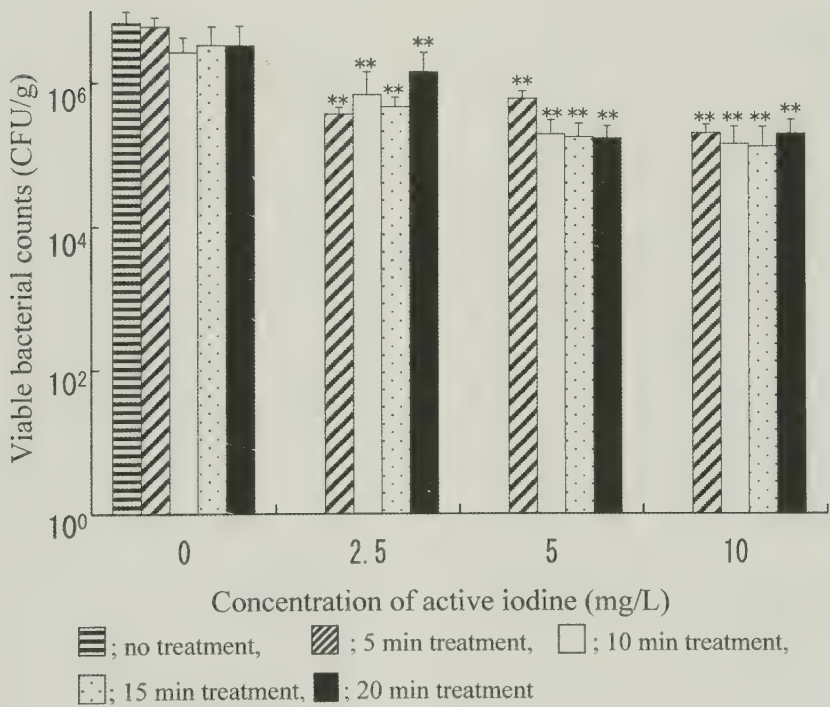


Fig. 12. Influence of povidon-iodine treatment on hatching rate at different developmental stages in kuruma prawn. Eggs were treated with 5 mg/L active iodine for 5 min. Eggs in the control of each developmental stage were incubated in sea water for 5 min. Experiments were done three times and each bar represents the mean value and standard deviations. Developmental stages are categorized as : A ; 2 or 4 cell stage, B ; 128 cell stage, C ; embryo with a ring-shaped middle part, D ; embryo with 1st antenna formed above 2nd appendage, E ; embryo with biramous 2nd and 3rd appendages, F ; embryo with appendages with exopodite and endopodite, G ; egg containing nauplius at an early developmental stage, H ; egg containing nauplius at a later developmental stage. Significant difference from the non-treatment group is indicated by*($p<0.05$). Non-treatment group represent eggs maintained in the original tank throughout the experiment period.

重比較検定) (Fig. 11)

次いで2.5 mg/Lのヨード液を作製し、作製直後と20分経過後に有効ヨウ素濃度を測定した。また、受精卵を今回の試験条件である0.33 g/L濃度となるように2.5 mg/Lのヨード液に収容し、20分間消毒処理を行った後、ヨウ素濃度を測定した(日本工業規格(JIS K 0102.工場排水試験方法33.3 残留塩素)(日本規格協会編2005)を改変)。その結果、作製直後のヨード液のヨウ素濃度に対し、受精卵を入れない場合の減衰率は $11.5\% \pm 1.65$ 、受精卵を入れた場合の減衰率は $19.7\% \pm 2.69$ となった。Student's *t*検定の結果、有意差は認められなかったことから($p > 0.05$)、今回の試験条件では受精卵の有無によるヨウ素濃度の減衰はなかったものと考えられた。

(2) 受精卵の発育段階と消毒の安全性

128細胞期以外のふ化率は、すべて80%以上の値を示したが、128細胞期におけるふ化率は、対照区およびヨード区でそれぞれ $63.5\% \pm 21.4$ および $71.6\% \pm 23.3$ となった。128細胞期の対照区のふ化率は、未処理区と比較し、有意($p < 0.05$, Dunnett法による多重比較検定)に低下した。ヨード区のふ化率は未処理区と比較し有意差は認められなかった(Fig. 12)。これらのことから、この8ステージに対しヨード剤による影響はないと考えられた。しかしながら、128細胞期におけるハンドリングの影響は、他の7ステージより大きいことが明らかになった。128細胞期は、水温22℃で産卵2時間後に到達するが、一般的な種苗生産現場では夜間産卵するクルマエビの採卵は朝行われるため、消毒時にはすでにこの時期は経過していて、実際には問題ないと考えられる。しかし、ハンドリングの影響を受け易いこの時期での消毒の実施は避けるべきであると考えられた。

ヨード剤は有効ヨウ素濃度5 mg/Lで10分まではクルマエビ受精卵に毒性がないとする報告(桃山, 1990)の他、有効ヨウ素濃度5 mg/Lで5分間の卵消毒で安全性を確認した報告(Mushiaki *et al.*, 1999)などがあり、これらと本実験結果は大きく変わらないことが確認された。受精卵に対する安全性が確認された有効ヨウ素濃度2.5および5.0 mg/Lで5分間の消毒処理により、本報における生菌数の減少率は、90%以上であり、殺菌効果が認められた。一方、WSSVは、有効ヨウ素濃度2.5 mg/Lで10分間(中野ら, 1998)や2.5 mg/L以上で0.2分以内、1.0 mg/Lでは2分以内(桃山, 谷村, 2004)で不活化されると報告されており、今回のヨード剤による安全な卵消毒条件はウイルスの不活化も期待できると考えられる。

これらの結果からヨウ素の減衰が起こらないことが

確認された卵密度(0.33 g/L)で、かつウイルスの不活化が確認されている有効ヨウ素濃度2.5~5.0 mg/Lの海水に、クルマエビ受精卵を5分間浸漬することは、安全かつ効果の期待できる卵消毒方法であると考えられる。

第3章 WSSVのrVP26およびrVP28を経口投与したクルマエビのWSSV攻撃に対する感染防御効果

1. 目的

クルマエビの種苗生産過程におけるWSSV防除対策として、PCRによるWSSVフリー産卵親魚の選別、ポピドンヨードによる受精卵消毒、ならびにWSSVフリー飼育水での育生が有効であり(Mushiaki *et al.*, 1999; Satoh *et al.*, 2001; 佐藤ら, 2003)、これらの対策によりWSSVフリーのクルマエビ種苗の産生が可能になった。しかしながら、中間育成および養殖過程では、飼育環境中に生息する他の甲殻類からもWSSVが検出されること(Maeda *et al.*, 1998; Momoyama *et al.*, 2003)、またWSSVの重要な感染経路とされる共食いや水系感染による水平感染(Wu *et al.*, 2001)の防止対策が確立されていないことから、WSDはクルマエビ養殖産業において未だ深刻な問題である。

Venegas *et al.* (2000)は、WSD生残クルマエビがWSSVの再感染に対し抵抗性を示すこと、また本現象が実験的にも再現されることから、無脊椎動物であるエビ類に“quasi-immune response”(免疫様現象)が存在することを報告した。また、感染耐過クルマエビに認められたWSSVに対する抵抗性は、感染後3週間から認められ始め、約2か月間持続すること(Wu *et al.*, 2002)、本抵抗性にはある程度の特異性が認められることが報告された(Venegas *et al.*, 2000)。さらに、ホルマリン不活化WSSVおよび大腸菌で発現したWSSVの主要構造タンパク質であるrVP26およびrVP28を筋肉内接種することで、同様の抵抗性が誘導されることも明らかにされた(Namikoshi *et al.*, 2003)。現在までに、クルマエビ科のwhite leg shrimpおよびウシエビにも同様の“quasi-immune response”が存在ことが明らかにされ、WSSVに対するワクチン効果の検討が成されている(Witteveldt *et al.*, 2004a, Witteveldt *et al.*, 2004b, Witteveldt *et al.*, 2006, Vaseeharan *et al.*, 2006)。先にも述べた如く、養殖エビにおけるWSSVの感染経路としては、共食いによる水平感染が重要であることが既に示されていることから(Wu *et al.*, 2001)、経口ワクチンの可能

性が強く示唆される。そこで本研究では、まず大腸菌発現 WSSV rVP26および rVP28を用いた経口ワクチンを作成し、その効果について筋肉内注射法、浸漬法および経口法による感染実験を行い、比較検討した。

2. 材料と方法

(1) 供試クルマエビと WSSV 源の調製

供試したクルマエビは、上浦庁舎で WSSV フリーとして種苗生産されたものを、また WSD の罹病歴のない宮崎県の養殖場の種苗生産施設で生産された平均体重4.0~7.0gの個体を用い、事前に nested PCR (木村ら, 1996; 野中ら, 1998) にて WSSV 陰性であることを確認した。クルマエビは、二重底に施した砂敷きの水槽に収容し、電気分解による殺菌海水をかけ流して飼育し ($24 \pm 1.8^\circ\text{C}$)、市販の配合飼料を1日当たり平均体重の3%量で給餌した。

攻撃用に用いた WSSV 磨砕液の作製は、野中ら (1998) に準じて行った。すなわち、WSD による瀕死個体の筋肉細胞を4倍量の PBS (リン酸緩衝液; Invitrogen) を加えて磨砕し、 4°C 、 $3,000 \times g$ 10分間の遠心分離後の上清を回収したものを WSSV 源とし、使用まで -85°C で保管した。

(2) クルマエビに対する WSSV の病原性試験

供試エビは150L水槽に47-63尾/ m^2 (底面積) の密度で収容し、筋肉注射、浸漬および経口による WSSV の攻撃試験を行った。WSSV の接種後、供試エビを14日間飼育し、累積死亡数を観察した。半数致死量 (LD_{50}) は、Behrenes-Kärber 法により産出した。

筋肉注射攻撃に用いる WSSV 源は PBS で 10^3 倍から 10^7 倍まで段階希釈した。筋肉注射による接種に供試するエビ (MBW 6.8 g, $n = 15$) は、 15°C に冷却した海水に1分間に浸漬し麻酔状態にした後、所定の濃度に PBS で希釈した WSSV を $100 \mu\text{L}/\text{shrimp}$ で筋肉注射した (陰性対照: PBS)。浸漬接種試験では、供試エビ (平均体重 4.4 g, $n=20$) は、WSSV を海水で 10^3 、 10^4 および 10^5 倍となるよう希釈した3Lのウイルス液に1時間浸漬した。陰性対照は、健康エビの磨砕液を 10^3 に希釈した海水に同様に浸漬した。浸漬攻撃が終了後、供試エビはネットに取り出し、清浄な海水により3分間の流水洗浄を行い、飼育水槽に再度収容した。経口接種試験では、供試エビ (平均体重 3.1 g, $n=15$) に対して、WSD 死亡個体の筋肉を0.25 g, 0.4 g, 0.65 g および 1.02 g/shrimp で投与した。供試エビの平均体重の15%を上限として、1日当たりの投与量を決定し ($\leq 0.47 \text{ g/shrimp}$)、0.65 g および 1.02 g 投与グループは2または3日間に分けて投与を行った。対照として、健康なクルマエビの筋肉を1.02

g 同様の方法で投与するグループを設けた。経口接種試験に用いた WSD 死亡個体の筋肉は、注射および浸漬接種に用いた WSSV 磨砕液の作成源と同じものを用いた。

(3) VP26および VP28遺伝子のクローニングと発現

1) ウイルス DNA 試料の調製

野中ら (1998) の RNase-PEG 沈法により、WSSV に感染したクルマエビ組織から WSSV の DNA 抽出液を調製した。すなわち、WSD 病エビ組織約0.2 g を $300 \mu\text{L}$ のプロテイナーゼ K (0.1 mg/mL) と SDS (10 mg/mL) の混合液とともに磨砕した後、 37°C で15分間静置した。これに等量の TE 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8.0$, 1 mM EDTA)-飽和フェノールを加え約1分間激しく攪拌した後、遠心分離 ($12,000 \times g$, 5分間) を行って水層を回収した。再度フェノール抽出を行った後、等量のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1) 混液を加えて約1分間激しく攪拌した。次いで、遠心分離 ($12,000 \times g$, 1min) を行って水層を回収し、1/10量の5M 酢酸アンモニア溶液および2.5倍量の100%エタノールを加えて混合した後、遠心分離 ($12,000 \times g$, 15分間) により沈殿を得た。得られた沈殿物を $200 \mu\text{L}$ の RNase A 溶液 ($20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, TE 溶液) に溶解し、 37°C で20分間処理した。その後、半量の20%ポリエチレングリコール (PEG-6,000) -2.5M NaCl 溶液を加えて攪拌し、遠心分離 ($12,000 \times g$, 5 min) を行い、上澄み液を完全に除去した。さらに、1.5mL の70%エタノールを加えて数秒間攪拌した後、遠心分離 ($12,000 \times g$, 2 min) を行い、上澄み液を完全に除去し、1.5mL の100%エタノールを加えた。これを、遠心分離 ($12,000 \times g$, 2 min) して上澄みを除去し、得られた沈殿を室温で約10分間乾燥させ、 $20 \mu\text{L}$ の TE に懸濁して DNA 抽出液とした。なお、遠心分離は全て室温で行った。

2) 外被タンパク質遺伝子クローニング用 PCR プライマー

GenBank に登録されている WSSV VP26および VP28タンパク質遺伝子の塩基配列 (GenBank 登録番号: AF173992および AF173993) に基づき、VP26F (5'-GTA AAG GAA GAA CTT CCA TC-3'), VP26R (5'-TAT ATT TGT ACA ATT CCC ACT TTA-3') および VP28F (5'-CAA GCA ACG TTC GAT AAA GA-3'), VP28R (5'-GAA GGT TAA GTA GGT CAA TAA-3') を作製した。

上記プライマーセット VP26F-VP26R は、WSSV VP26遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF, nt 35-649) を含む670塩基を増幅標的とし、VF28F-VP28R は VP28遺伝子の ORF (nt 33-647) を

含む754塩基を標的とするものである。なお、増幅反応の反応条件は、72℃ -10分間および95℃ -9分間の反応後、95℃ -1分間、55℃ -1分間、72℃ -1分間を1サイクルとし計30サイクル行った後、72℃ -5分間とした。

3) VP26および VP28遺伝子のクローニング

VP26F-VP26R および VF28F-VP28R を用い、WSSV DNA 試料から VP26および VP28遺伝子の増幅産物を、付属のプロトコールに従いプラスミドベクター pCR-Script SK (+) (Stratagene) の *Srf*I 部位へ挿入した後、大腸菌 DH5αコンピテント細胞を形質転換した。得られた形質転換菌はアンピシリンを含む LB 寒天培地上で培養し、同培地上で青色コロニーを選択することで DNA 断片を有する組換え菌を選択した。

クローニングした遺伝子の塩基配列は、ダイターミネーターサイクルシーケンシングキット (Dye primer thermal cycle sequence kit) (ABI 社) および T3/T7ダイプライマー (T3/T7 dye primer) (ABI

社) を用い、定法に従い行い、自動シークエンサー (373A DNA シークエンサー, ABI社)により解析した。解析結果より、VP26および VP28遺伝子がクローニングされていることが確認された (Fig. 13, 14)。

4) rVP26および rVP28発現系の構築

VP26遺伝子の発現用プライマーとして VP26F の5' 端側に *Nde* I および *Eco* RI の認識配列を含む11塩基のリンカー配列 (5'-aaagaattcat-3') を付加した計31塩基長の VP26expF プライマー (5'-aaagaattcat-ATG GAA TTT GGC AAC CTA AC-3') および VP26R の5' 端側に *Sal* I の認識配列を含む9塩基のリンカー配列 (5'-gctgtcgac-3') を付加した計31塩基長の VP26expR プライマー (5'-gctgtcgac-TTA CTT CTT CTT GAT TTC GTC C-3') を作製した。また、VP28遺伝子発現用プライマーとして、VP28F の5' 端側に *Nde* I および *Eco* RI の認識配列を含む11塩基のリンカー配列 (5'-aaagaattcat-3') を付加した計34塩基長の VP28expF プライマー (5'-aaagaattcat-ATG GAT CTT TCT TTC ACT CTT TC -3') および

Nucleotide sequence of structural protein (VP26) gene of WSDV

GGATCCAACCAACACGTAAAGGAAGAACTTCCATCTAAAACAAAGAAAAATGGAATTTGGCA
ACCTAACAACCTGGACGTTGCAATTATTGCAATCTTGTCCATTGCAATCATTGCTCTAATCGTT
ATCATGGTTATAATGATTGTATTCAACACACGTTGTTGGAAGAAGCGTCGTCGCTAATTATGATCA
GATGATGCGAGTCCCAATTCAAAGAAGGGCAAAGGTAATGTCAATTCGTGGAGAGAGGTCCTA
CAATACTCCTCTTGGAAAGGTGGCCATGAAGAATGGTCTCTCCGATAAGGACATGAAGGATGT
TTCTGCTGATCTTGTGATCTCTACCGTCACAGCCCCAAGGACTGATCCCGCTGGCACTGGGGCC
GAGAACTCTAACATGACTTTGAAGATCCTCAACAACACTGGCGTCGATCTTTGATCAACGAC
ATTACTGTTTCGGCCAACTGTTATTGCAGGAAACATTAAGGGAAATACTATGTGCAACACTTACT
TCTCGAGCAAGGACATTAATCTTCATCTTCAAAAATTACCCTCATTGACGTGTGCAGCAAATT
TGAAGACGGCGCAGCCTTCGAAGCTACAATGAACATTGGATTACCTCCAAGAATGTGATCGA
TATCAAGGACGAAATCAAGAAGAAGTAAGTGGGAATTGTACAAATATAAAGGTTTTGTTGA
ATAAAAA

ATG : initial codon

TAA : stop codon

Amino acid sequence of structural protein (VP26) of WSDV

MEFGNLTNLDVAIIAISIAIALIVIMVIMIVFNTRVGRSVVANYDQMMRVPIQRRRAKVMSIRGERS
YNTPLGKVAMKNGLSDKDMKDVSADLVISTVTAPRTDPAGTGAENSNMTLKILNNTGVDLLIND
ITVRPTVIAGNIKGNTMSNTYFSSKDIKSSSSKITLIDVCSKFEDGAAFEATMNIGFTSKNVIDIKDEI
KKK

Fig. 13. Nucleotide sequence and amino acid sequence of structural protein (VP26) of WSDV. Primer sequences underlined (—), Green coloring indicate the nucleotide sequence of VP26 coded gene.

Nucleotide sequence of structural protein (VP28) gene of WSDV

TCTTAATAACCAAGCAACGTTCGATAAAGAAAAACTCGTCAATGGATCTTTCTTTCACTCTTT
CGGTCTGTGTCGGCCATCTCGCCATCACTGCTGTGATTGCTGTATTTATTGTGATTTTTAGGTATC
ACAACACTGTGACCAAGACCATCGAAACCCACACAGACAATATCGAGACAAACATGGATGAA
AACCCTCCGCATTCTGTGACTGCTGAGGTTGGATCAGGCTACTTCAAGATGACTGATGTGTCCT
TTGACAGCGACACCTTGGGCAAAATCAAGATCCGCAATGGAAAGTCTGATGCACAGATGAAG
GAAGAAGATGCGGATCTTGTTCATCACTCCCGTGGAGGGCCGAGCACTCGAAGTGACTGTGGG
GCAGAATCTCACCTTTGAGGGAACATTCAAGGTGTGGAACAACACATCAAGAAAGATCAACAT
CACTGGTATGCAGATGGTGCCAAAGATTAAACCCATCAAAGGCCTTTGTCTGGTAGCTCCAACAC
CTCCTCCTTCACCCCCGTCTCTATTGATGAGGATGAAGTTGGCACCTTTGTGTGTGGTACCACC
TTTGGCGCACCAATTGCAGCTACCGCCGGTGGAATCTTTTCGACATGTAACGTGCACGTACCT
ACTCTGGCACTGAGACCGAGTAAATAAATCGTGCTTTTTTATATAGATAGGGAATTTTAATATTA
CAACAATAAGAAAATAAAACAATTGAGGAAATTTATACCATATTATTATGACCTACTTAACCTTC
TTGCTATACAATGAAT

TCA : initial codon

TAA : stop codon

Amino acid sequence of structural protein (VP28) of WSDV

MDLSFTLSVVSAIAITAVIAVFIVIFRYHNTVTKTIETHDNIETNMDENLRIPVTAEVGSGYFKMT
DVSFSDTLGKIKIRNGKSDAQMKEEADLVITPVEGRALEVTVGQNLTFEGTFKVWNNTSRKINI
TGMQMVPKINPSKAFVGSSTSSFTPVSIDEDEVGTFVCGTTFGAPIAATAGGNLFDMYVHVTYS
GTETE

Fig. 14. Nucleotide sequence and amino acid sequence of structural protein (VP28) of WSDV. Primer sequences underlined (—), Green coloring indicate the nucleotide sequence of VP28 coded gene.

VP28R の5' 端側に Sal I の認識配列を含む 9 塩基のリンカー配列 (5' -gctgtcgac-3') を付加した計27塩基長の VP28expR プライマー (5' - gctgtcgac-TTACTCGGTCTCAGTGCC- 3') を作製した。

VP26expF-VP26expR および VP28expF-VP28expR を用い、WSSV VP26 および VP28 遺伝子を PCR 増幅 (72℃ -10 min, 95℃ -9 min, 30 cycles of 95℃ -1 min, 55℃ -1 分間, 72℃ -1 min, and 72℃ -5 min) した後、フェノール／クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により増幅産物を濃縮した。増幅産物は 1 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供した後、GeneClean kit を用いて目的の DNA 断片を回収し、Nde I および Sal I で処理した後、発現ベクター pET-25b (+) (Novagen) の Nde I-Sal I 部位にライゲーションキット (タカラバイオ社) を用いて組み込み、大腸菌 BL21 のコンピテント細胞の形質転換に用いた。得られた rVP26 および rVP28 遺伝子を発現する大腸菌株を各々 pET VP26 および pET VP28 株と呼ぶ。

5) rVP26 および rVP28 発現系を用いた rVP26 および rVP28 の発現

大腸菌 pET VP26 および pET VP28 を LB-amp 液体培地 (1% bact-trypton, 0.5% bact-yeast extract, 1% NaCl, pH7.4, 50 μ g/mL ampicillin) を用い、菌体濁度 (OD₆₆₀) が 0.5 程度になるまで (約 6 時間), 37℃ で振とう培養した。培養液に終濃度が 1mM となるよう IPTG (isopropyl - β - D (-) - thiogalactopyranoside) を添加し、さらに 37℃ で 3 時間培養することで標的遺伝子を発現させた。培養液を 4℃ で一晩静置し、遠心分離 (930 × g, 20min, 4℃) した後細胞を TE 緩衝液に懸濁し、Triton X-100 およびリゾチームを終濃度が 0.1% および 100 μ g/mL となるよう添加し、30℃ で 15 分間処理した。菌体懸濁液を超音波破碎処理した後、遠心分離 (12,000 × g, 15 min, 4℃) に供し、遠心分離後の沈殿物を rVP26 および rVP28 の発現タンパク質ワクチンとして 15mL の PBS に懸濁した。

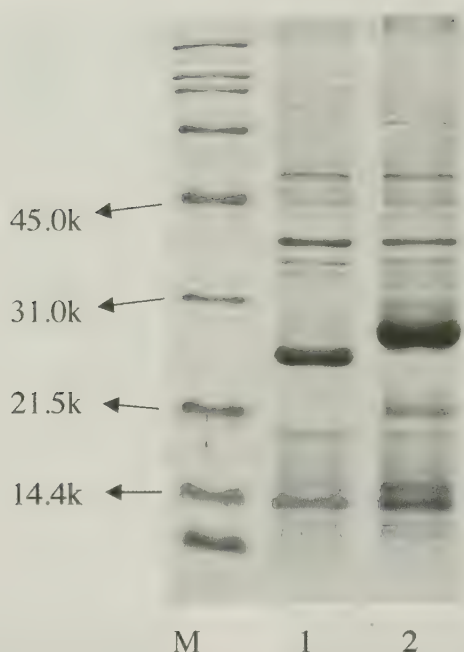


Fig. 15. SDS-PAGE analysis of expressed proteins, rVP26 and rVP28 of WSSV. The proteins in the 12% gel were stained with Coomassie brilliant blue. lanes M : molecular marker, lanes 1 : rVP26, lanes 2 : rVP28.

rVP26およびrVP28懸濁液は、SDS-PAGE電気泳動 (Laemmli, 1970) に供した後、クマーシーブリリアントブルー (CBB) で染色を施した。その結果、rVP26およびrVP28の分子量は、各々 25.5 kDa および 27.8 kDa で、WSSV VP26およびVP28の分子量と一致した。さらに、rVP26およびrVP28のSDS-PAGE電気泳動像を画像解析ソフト (Image J : NIH : National Institutes of Health, 米国国立衛生研究所) により解析した結果、rVP26とrVP28の純度は、各々 20.3% および 30.8% であった (Fig. 15)。

6) rVP26およびrVP28の経口投与とWSSVによる攻撃試験

rVP26あるいはrVP28を配合飼料の5%量PBSに懸濁し、市販配合飼料に添加し (Maruha Co., Ltd), 混合攪拌後、配合飼料の0.5%量の展着剤 (SD Tenchaku 1 Gou, Schering - Plough Animal Health k.k.) を添加し乾燥させ、クルマエビの経口ワクチンとして使用した。rVP26およびrVP28懸濁液の配合飼料添加量は、5% (W/W) とした。

供試クルマエビ (平均体重 6.8g) を4試験区に分け (n=150), rVP26あるいはrVP28添加飼料を 35 μ g/g shrimp/日 (rVP濃度: 10 μ g/g shrimp/日) ずつ、また E. coli タンパク質添加飼料を 25 μ g/g shrimp/

日、およびPBS配合飼料を各々15日間投与した。経口ワクチン投与25日後、各供試エビをさらに4区 (n=12~15) に分け、筋肉注射摂取、浸漬摂取および経口摂取によるWSSVの攻撃試験に供した (rVP26およびrVP28投与区は duplicate)。筋肉注射では、第1と第2腹節の間から、PBSで 10^{-4} に希釈したWSSVを100 μ L/shrimp ずつ接種した。浸漬攻撃では、WSSVを 10^{-4} に希釈した海水に1時間浸漬し、経口攻撃ではWSD死亡個体の筋肉を 0.6 g/ shrimp/3日間で投与した。これらのWSSV攻撃量は、Table 8, Fig. 16に示した半数致死量から、ワクチン非投与区の累積死亡率が70%となる量である。

感染実験中、死亡個体は1日に2度回収し、これらがWSSVの感染による死亡であることを確認するた、後にPCRに供するまで -30°C で保管した。

7) 有意差検定および相対生残率

各試験区の累積死亡率は、 χ^2 検定による有意差検定を行った (5%水準)。期待度数が5以下となる場合は、Fisherの直接確率計算法で検定を行った。

相対生残率 (relative percent survival RPS) は、計算式 1- ワクチン投与区の累積死亡率 / 非投与対照区の累積死亡率 $\times 100$ (Amend, 1981) により算出した。

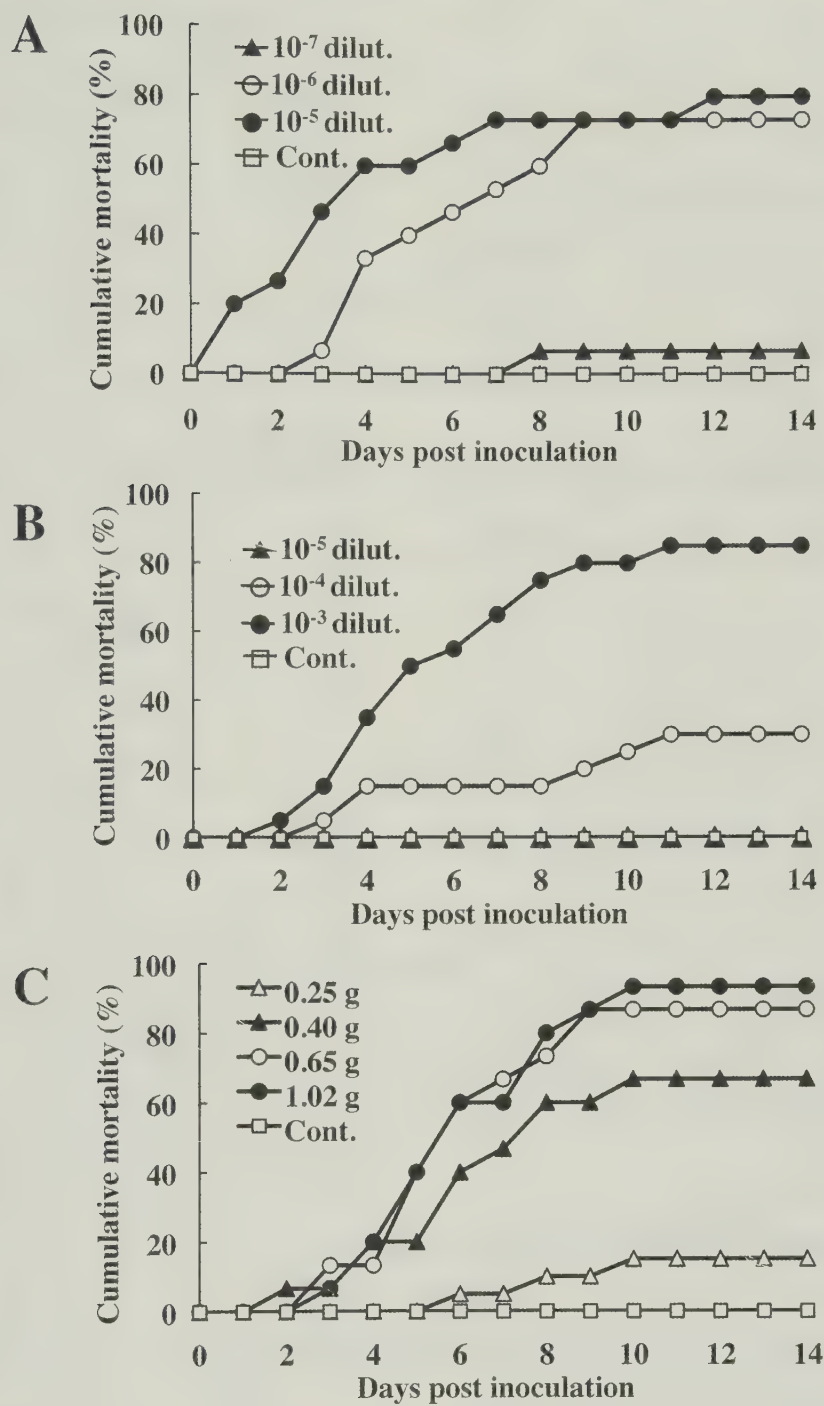


Fig. 16. Cumulative mortality of kuruma shrimp after experimental WSSV challenge by three routes. (A) IM challenge with 0.1 ml of diluted WSSV solution, (B) Immersion challenge with diluted WSSV solution, and (C) Oral challenge with WSD shrimp muscle.

3. 結 果

(1) クルマエビに対する WSSV の病原性

WSD 罹病エビ筋肉およびその磨砕液の希釈液を用い、筋肉内注射、浸漬および経口的に WSSV 攻撃を行い、各攻撃法における WSSV の病原性について検討した結果を図16に示した。まず、WSSV 原液の $10^{5.0}$ 倍希釈液を筋肉内接種した区では、ウイルス攻撃の翌日から死亡が認められ始め、飼育 2 週間後までに累積死亡率は80%に達した。 $10^{6.0}$ 倍希釈液を筋肉内接種した区では、攻撃後 3 日目から死亡が認められ始め、累積死亡率は73%であった。これに対し、 $10^{7.0}$ 倍希釈液を筋肉内接種した区では、攻撃後 8 日目に 1 尾が死亡したが、その後の死亡は認められず、累積死亡率は6.7%であった (Fig. 16-A)。以上の結果より、供試 WSSV 磨砕液の半数致死量 (LD_{50}) は $10^{-7.0}$ mL/shrimp と算出された (Table 8)。同 WSSV 原液の $10^{3.0}$ 、 $10^{4.0}$ および $10^{5.0}$ 倍希釈液を用いた浸漬攻撃では、 $10^{3.0}$ および $10^{4.0}$ 倍希釈液攻撃区で、攻撃後 2 ~ 3 日目から死亡がはじまり、各々の累積死亡率は85% および30%であった。これに対し、 $10^{5.0}$ 倍希釈液攻撃区では死亡は認められなかった (Fig. 16-B)。したがって、供試 WSSV 磨砕液の浸漬攻撃における LD_{50} は $10^{-3.7}$ mL と算出された (Table 8)。上記実験に用いた WSSV 源と同じ WSD 罹病エビ筋肉を0.25 g/尾、0.40 g/尾、0.65 g/尾および1.02 g/尾ずつ経口投与した攻撃区での累積死亡率は、各々 15%、67%、87% および93%で、本罹病エビ筋肉の LD_{50} は、0.37 g/shrimp と算出された (Fig. 16-C, Table 8)。なお、何れの攻撃法においても、対照区での死亡は認められなかった。

(2) rVP26および rVP28経口投与による WSSV に対する防御効果

WSSV rVP26および rVP28を経口投与したクルマエビに対し、対照区の累積死亡率が70%となるような WSSV 量で経口、浸漬および筋肉内接種攻撃した場合の死亡率の変化を Fig.17に示した。経口攻撃区では、rVP26および rVP28を投与したクルマエビに死亡は認められなかったが、大腸菌タンパク質を投与区ならびに対照区では攻撃 3 日後ないし 7 日後から死亡が始まり、累積死亡率は各々 31% および67%であった (Fig. 17-A)。浸漬攻撃区では、攻撃後 4 日後から 8 日後に死亡が認められ始め、rVP26、rVP28、大腸菌タンパク質投与区および対照区の累積死亡率は、各々 21%、22%、57% および73%であった (Fig. 17-B)。一方、筋肉内接種攻撃区では、攻撃後 4 日目から死亡がはじまり、rVP26、rVP28、大腸菌タンパク質投与区および対照区の累積死亡率は、各々 31%、52%、93% および79%であった (Fig. 17-C)。なお、WSSV 非攻撃区における死亡は、認められなかった。

経口ワクチンを投与したクルマエビを、経口、浸漬、筋肉内注射により WSSV 攻撃し、死亡および生残した個体からの PCR による WSSV 検出結果を Table 9 に示した。非投与対照区 (PBS 区) における全ての死亡個体から 1step PCR で WSSV が検出され、生残個体でも66.7%以上から nested PCR で WSSV が検出された。rVP26および rVP28投与群の生残個体からは、33-60%が 1step PCR で、73.3-100%が nested PCR で WSSV 遺伝子が検出された。しかし、rVPs 投与個体の攻撃試験後の生残個体は、経口攻撃の生残個体の一部 ($\leq 10\%$ の陽性率) から nested PCR で WSSV 陽性となったものの、ほとんどの個体は WSSV 陰性で

Table 8. Virulence of WSSV in kuruma shrimp challenged by intramuscular, immersion and oral routes

Challenge route	50% of lethal dose (LD_{50})	
	Measured value ^a	Converted value (g shrimp ⁻¹)
Intramuscular	$10^{-7.0}$ ml shrimp ⁻¹	$10^{-7.7}$
Immersion	$10^{-3.7}$ ml ml ⁻¹	$10^{-4.4}$
Oral	0.37 g shrimp ⁻¹	$10^{-0.4}$

^a Measured values were calculated from the data shown in Fig. 2

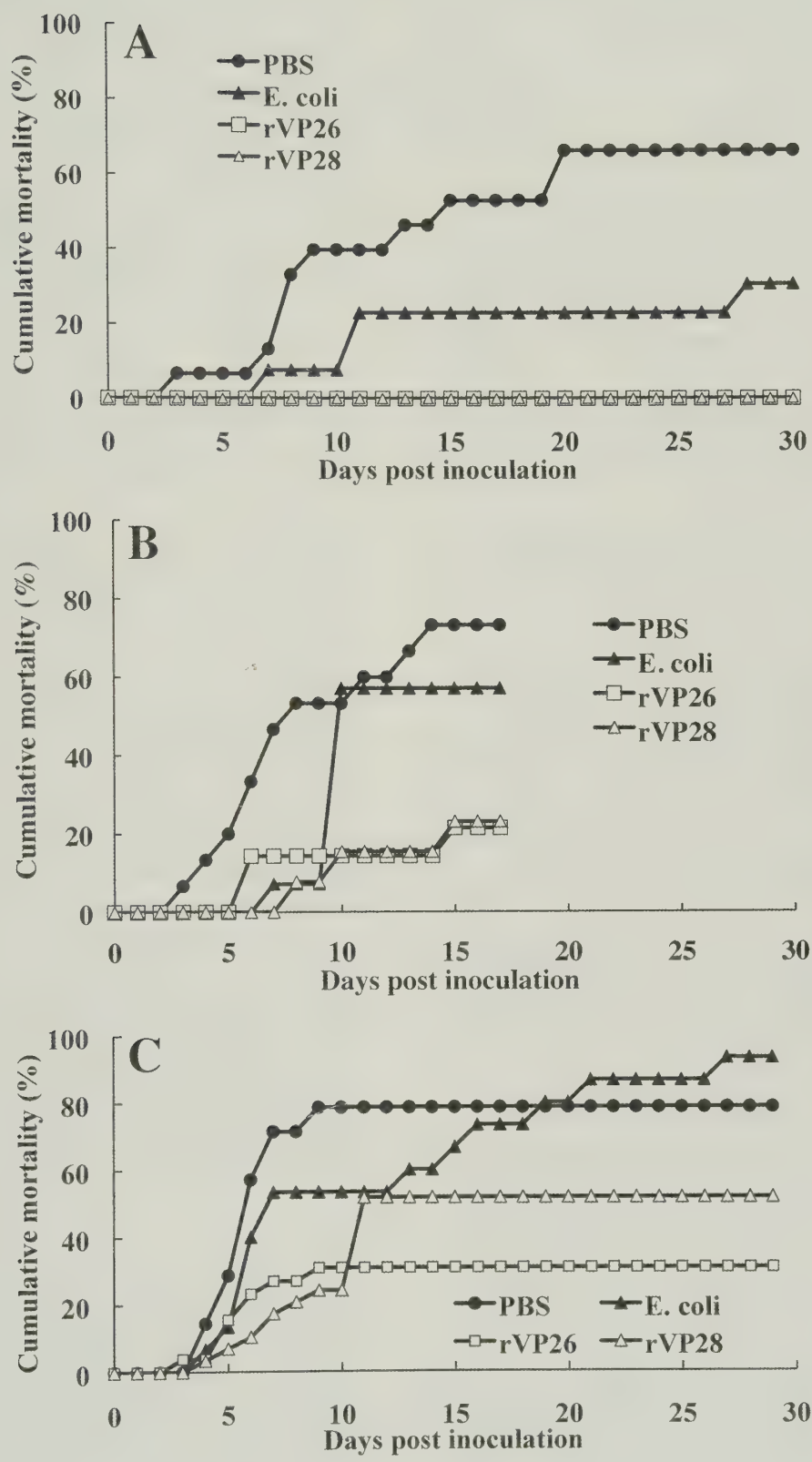


Fig. 17. Cumulative mortality of kuruma shrimp vaccinated orally with WSSV rVP26 or rVP28 and challenged with WSSV by. (A) Oral challenge, (B) Immersion challenge, and (C) IM challenge.

Table 9. PCR detection of WSSV in orally vaccinated shrimp after experimental challenge with WSSV by oral, immersion, and IM routes

Detection rate of WSSV (Positive numbers/Examined numbers)														
Antigen	Oral challenge				Immersion challenge				IM challenge				Mock challenge	
	Dead		Survivors		Dead		Survivors		Dead		Survivors		Survivors	
	PCR	Nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR	PCR	nested PCR
rVP26	-	-	0% (0/30)	6.7% (2/30)	50.0% (3/6)	83.3% (5/6)	0% (0/22)	9.1% (2/22)	50.0% (4/8)	100% (8/8)	0% (0/18)	38.9% (7/18)	0% (0/12)	0% (0/12)
rVP28	-	-	0% (0/30)	10% (3/30)	33% (2/6)	83.3% (5/6)	0% (0/21)	0% (0/21)	60.0% (9/15)	73.3% (11/15)	0% (0/14)	35.7% (5/14)	0% (0/12)	0% (0/12)
<i>E. coli</i>	100% (4/4)	100% (4/4)	0% (0/9)	0% (0/9)	12.5% (1/8)	50.0% (4/8)	0% (0/6)	0% (0/6)	100% (13/13)	100% (13/13)	0% (0/1)	0% (0/1)		
PBS	100% (10/10)	100% (10/10)	40.0% (2/5)	100% (5/5)	100% (11/11)	100% (11/11)	25.0% (1/4)	75.0% (3/4)	100% (11/11)	100% (11/11)	0% (0/3)	66.7% (2/3)		

あった。すなわち、rVPs 投与個体群の生残エビにおける WSSV 陽性率は、非投与群に比べ有意に低いことが確認された

以上の結果から、rVP26、rVP28および大腸菌タンパク質投与区の RPS を算出した結果、rVP26経口投与し、経口、浸漬および筋肉注射により攻撃した区の RPS は各々 100%、71% および 61%、一方 rVP28投与区では、100%（経口）、70%（浸漬）および 34%（筋肉注射）となった。rVPS の経口投与群の RPS 値は、rVP28投与区の筋肉注射攻撃（34%）を除けば、全て 60% 以上であった。一方、大腸菌タンパク質投与区の RPS（%）は、経口攻撃区で 54% であったが、浸漬および筋肉注射攻撃では各々 22% および 0% と、累積死亡率でも rVP26 および rVP28 投与群とは有意に低いことが確認された（Table 9）。

4. 考 察

本研究では、WSSV rVP26 および rVP28 を用いた経口ワクチンの開発を目的に、まず筋肉内接種、浸漬および経口投与攻撃による WSSV の病原性について検討した。各攻撃法での LD₅₀ は 10^{-7.0} mL/shrimp、10^{-3.7} mL/shrimp および 0.37 g/shrimp と算出された（Table 7）。各攻撃法に用いた WSSV 源は、何れも同一ロットの罹病エビ筋肉から調製したものであることから、各攻撃法の LD₅₀ を罹病エビ筋肉量に換算したところ、筋肉注射攻撃では 10^{-7.7} g 筋肉組織/shrimp、浸漬では 10^{-4.4} g 筋肉組織/shrimp、および経口攻撃法では 10^{-0.4} g 筋肉組織/shrimp となり、経口感染では浸漬攻撃の 10^{1.1} 倍量、筋肉注射感染の 10^{7.3} 倍量の WSSV が必要となり、経口感染による感染効率は、浸漬感染と筋肉注射に比較して大幅に低い

ことが明らかになった（Table 7）。Escobedo-Bonilla *et al.* (2005, 2006) は、WSSV の攻撃量の標準化を行い、経口法により筋肉注射法と同程度の累積死亡を誘導するためには、10 倍の WSSV が必要であることを報告している。しかし、本実験結果では、経口感染と筋肉注射感染の効率の差は、10^{7.3} 倍であり、Escobedo-Bonilla *et al.* (2005, 2006) の結果と大きく異なっていた。半数致死に必要な WSSV 量は、実験供試種あるいはウイルス株により異なる可能性があるが、何れにせよ経口法による感染効率が他の攻撃法に比べ明らかに低いことが改めて確認された。Wu *et al.* (2001) および Momoyama and Muroga (2005) は、クルマエビの飼育密度の軽減、あるいは共食いの阻止により WSD による累積死亡率が大幅に軽減することを明らかにし、さらに WSSV の感染経路として共食いが重要な要因であることを指摘した。すなわち、経口感染における WSSV の感染効率は極めて低いが、罹病エビ筋肉を摂餌することで大量の WSSV が体内に取り込まれ、結果的に累積死亡率に大きく影響するのではないかと考えられる。本実験においても、共食いが頻発していたことを確認しており、共食いが累積死亡率に影響した可能性が高い。共食いによる経口感染の影響を排除するためには、Wu *et al.* (2001) が行った個別飼育実験法が不可欠である。しかし、本研究の目的は、WSSV rVPs を経口投与したエビの防御効果の検討であり、エビ養殖場では共食いが頻発することを考え合わせると、養殖現場に近い飼育環境下で効果判定を行う必要があると考え、本研究ではあえて集約的飼育法により感染実験を行うこととした。

ところで Namikoshi *et al.* (2004) は、WSSV rVP26、rVP28 およびホルマリン不活化 WSSV をク

クルマエビに筋肉内接種することで、また Wittevedt *et al.* (2004b, 2006) は、rVP28をウシエビおよび White leg shrimp に経口投与することで、WSSV に対する感染防御効果が誘導されることを報告している。しかし、Namikoshi *et al.* (2004) ではワクチンを筋肉内接種し、筋肉内注射による攻撃を行っており、Wittevedt *et al.* (2004b, 2006) は、ワクチンを経口投与して、浸漬攻撃による効果をみたものであり、ワクチンを経口投与したエビの経口攻撃による効果判定を行った報告はみあたらない。

先に示した如く、共食いは WSSV の感染経路として重要であることから、経口ワクチンエビの経口攻撃による検証が必要であると考え、本研究では rVP26, rVP28 および大腸菌タンパク質を経口投与し、経口攻撃に加え、浸漬および筋肉内接種で攻撃し、各攻撃法における経口ワクチンの効果を比較検討した。まず、各攻撃法実験対照区におけるクルマエビの累積死亡率が各々 67~79% であったことから、各攻撃法における WSSV 量が適切であったと考えられた (Table 10)。一方、このような攻撃強度でも rVP26 あるいは rVP28 を経口投与したクルマエビの経口攻撃での RPS は何れも 100% で、同エビを浸漬攻撃した場合においても、RPS はいずれも 70% 以上となり、十分な防御効果が認められた。さらに、経口ワクチン区と非投与区の WSSV 陽性率の明らかな違いが確認された (Table 9)。したがって、rVP26 および rVP28 の経口投与は、WSSV の経口感染に対しても十分な防御効果を誘導できることが確認できた。特に、rVP26 あるいは rVP28 を経口投与したクルマエビに対し、注射攻撃をした時の RPS は、各々 61% および 34% であり、その感染防御効果は経口あるいは浸漬攻撃法で認められた効果に比べ低かった (Table 9)。Namikoshi *et al.* (2004) は、rVP26, rVP28 を筋肉内接種することで

WSSV に対する感染防御効果が誘導されることを報告している。本実験結果では、rVP26 あるいは rVP28 を経口投与したクルマエビが、浸漬感染あるいは筋肉注射感染よりはるかに多量 (Table 8) の WSSV が接種された経口攻撃に対してもまた十分な防御効果を示し、さらに経口攻撃試験における RPS 値が浸漬攻撃あるいは筋肉注射攻撃での RPS を上回っていた。この結果は、Wu *et al.* (2001) および Momoyama and Muroga (2005) が指摘した「共食いによる WSSV の経口感染」の重要性を強く支持するものであり、さらに rVP26 および rVP28 の経口投与によりクルマエビ養殖場で危惧される「共食いによる WSSV の水平的伝播」を阻止できる可能性を示唆するものと考ええる。本実験では、Fig. 15 に示すように rVPs に *E. coli* タンパク質が含有したため、*E.coli* 投与区を対照群の一つとして準備したところ、その RPS は経口攻撃で 54%、浸漬攻撃で 22% と、低いレベルではあるものの WSSV に対する防御効果が認められた (Table 9)。Itami *et al.* (1998), Cheng *et al.* (2005) および Stritunyalucksana *et al.* (1999) は、*E. coli* 由来タンパク質を投与することで、エビの生体防御能が賦活化され、WSSV に対しても抵抗性を示す、いわゆる免疫賦活効果を報告している。本実験結果で認められた *E. coli* 由来タンパク質を投与区の WSSV に対する防御能は、Itami *et al.* (1998), Cheng *et al.* (2005) および Stritunyalucksana *et al.* (1999) の示した免疫賦活効果に起因したのもであると推察している。

ところで、Wu *et al.* (2002) は、WSSV 感染体過エビの WSSV に対する抵抗性は、感染後 3 週間後から誘導され、その後、約 2 か月間持続することを報告しているが、Namikoshi *et al.* (2004) は、ホルマリン不活化 WSSV を筋肉内接種により誘導された防御効果が自然感染による防御効果ほど長期間持続しないこと

Table 10. Protection against WSSV challenge by oral, immersion, and IM routes in kuruma shrimp vaccinated orally with rVP26 and rVP28.

Antigen	Oral challenge			Immersion challenge			IM challenge			Mock challenge	
	n	Mortality (%)	RPS (%)	n	Mortality (%)	RPS (%)	n	Mortality (%)	RPS (%)	n	Mortality (%)
rVP26	30	0*	100	28	21*	71	26	31*	61	12	0
rVP28	30	0*	100	27	22*	70	29	52	34	12	0
<i>E. coli</i>	13	31	54	14	57	22	14	93	0		
PBS	15	67		15	73		14	79			

*Significantly different (1% level) from the non-vaccinated groups by χ^2 test.

を報告している。本研究で、rVP26およびrVP28を経口投与することで、十分な感染防御効果が誘導可能であることが明らかになったが、本感染防御効果の誘導開始時期ならびに持続期間については、重要な課題であり、第4章にて別途検討した

第4章 WSSV rVP26およびrVP28を経口投与した クルマエビのWSSVに対する感染防御能の 持続期間と特異性

1. 目的

WSSVに自然感染し生き残ったクルマエビがWSSVに対する再感染に抵抗性を示すこと、その抵抗性が感染後3週間から認められ始め約2か月間持続することから、無脊椎動物であるクルマエビの免疫様現象の存在が明らかにされた (Venegas *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002)。また、本免疫様現象は、WSSVの構造タンパク質を大腸菌で発現させたrVPsを筋肉接種することでも誘導可能であることが確認され、WSSVに対するワクチン開発の可能性が示唆された (Namikoshi *et al.*, 2004)。さらに、第3章において、rVPsを経口投与したクルマエビは、WSSVによる経口、浸漬および筋肉内接種攻撃に対し十分な抵抗性を示すことが明らかになり、実用的な「WSSV経口ワクチン」の開発が具体化されつつある。WSSVのrVPsを用いた経口ワクチンの効果については、ウシエビ、ホワイトレグシュリンプでも実証されている (Witteveldt *et al.*, 2004a; Witteveldt *et al.*, 2004b; Witteveldt *et al.*, 2006; Vaseeharan *et al.*, 2006)。しかしながら、rVPsを経口投与したエビのWSSVに対する防御効果の持続期間については、ほとんど明らかにされていない

そこで本章では、WSSV rVP26およびrVP28を経口投与したクルマエビを経時的にWSSV攻撃することで、経口ワクチンによる防御効果の発現時期および持続期間について検討するとともに、rVPs経口ワクチンの追加投与効果について検討した。

2. 材料と方法

(1) 供試クルマエビと接種WSSV

宮崎県の養殖場の種苗生産施設で飼育された、WSD感染履歴のないクルマエビ (平均体重0.08-0.09g) を、予めnested PCR (Kimura *et al.*, 1996) でWSSV陰性であることを確認した後、実験に供した。供試エビは、二重底の上面に砂を敷き詰めたFRP製の水槽を用い、電解処理海水 (0.3 mg/L, $23 \pm 1^\circ\text{C}$) を脱塩素処理をして飼育し、体重の3~20%に当たる市販配

合飼料を毎日1~4回給餌した。

攻撃試験に用いるWSSV液の調整は、第3章に記した方法で行った。すなわち、WSD罹病クルマエビの筋肉を4倍量のPBSで磨砕し、遠心分離 ($3,000 \times g$, 10 min, 4°C) により得た上清を回収し、WSSV源として使用するまで -85°C に保存した。

(2) WSSV rVP26およびrVP28含有配合飼料の調製

WSSVのrVP26およびrVP28の発現およびrVPs含有配合飼料の調製は、第3章に示した方法と同様に行った。すなわち、pET-VP26あるいはpET-VP28で形質転換した大腸菌をLB-Amp液体培地に接種し、 37°C で時間振とう培養し、濁度 (OD_{660}) が0.5程度に達したところで、遠心分離により大腸菌を回収し、1 mM IPTG 含 LB-Amp 液体培地に再懸濁し、 37°C で3時間振とう培養した。大腸菌細胞を遠心分離 ($930 \times g$, 10分, 4°C) により回収し、Triton X-100で処理した後、超音波処理により核酸を破壊し、さらに遠心分離 ($12,000 \times g$, 15分, 4°C) によりrVPsを回収した。rVPsをPBSに懸濁した後、市販配合飼料と1:19の割合で混合、攪拌し、さらに配合飼料に対して0.5%量の展着剤 (武田シュリング・アニマルヘルス) を加え乾燥させることで、rVPs含有配合飼料を調製した

(3) rVP26およびrVP28の経口投与とWSSVによる攻撃試験

実験I. WSSVに対する感染防御効果の発現時期および持続期間

クルマエビ780尾 (平均体重 92 ± 34 mg) を210 L容量のFRP製水槽に収容し、rVP26およびrVP28を $10 \mu\text{g/g}$ shrimp/日、大腸菌タンパク質 (投与対照区) を $25 \mu\text{g/g}$ shrimp/日、PBS (非投与対照区) を含む配合飼料を1日当たり体重の20%量の給餌率で、15日間連続して経口投与した。Table 11のスケジュールに従い、投与開始から29, 36, 45, 55, 75, 106, 112, 119, 126および135日目にWSSVによる攻撃試験を行い、それぞれの累積死亡率からRPSを算出した。なお、WSSVによる攻撃は、全て浸漬法で行った。すなわち、20~25尾のエビをバケツに収容し、対照区の累積死亡率がおおよそ70%となるように調整したWSSV攻撃液 (WSSV液を海水で $10^{4.0}$ 倍希釈) に1時間浸漬した。浸漬後、クルマエビを清浄な海水により流水洗浄し、150 L容の二重底仕様のFRP製水槽に収容した。攻撃後30日間にわたり、各区の累積死亡の推移を観察し、また死亡個体は毎日2度回収し、WSSVの感染による死亡であることをPCRにより確認するため -30°C に保存した。

実験Ⅱ. rVPs 経口ワクチンの追加投与効果

実験Ⅰで rVP26, rVP28, 大腸菌タンパク質, あるいは PBS を経口投与した各区クルマエビを本実験にも供した。初回ワクチン投与により誘導された WSSV に対する感染防御能が半減した時期, すなわち初回投与から75日目に各ワクチン投与区のクルマエビを65尾ずつ150 L 容量の FRP 製水槽 4 つに分槽し, 初回投与と同じタンパク質を含む配合飼料を7日間追加投与した。投与量は, rVP26および rVP28 は10 μ g/g shrimp/ 日, 大腸菌タンパク質は25 μ g/g shrimp/ 日とした初回経口投与から106および135日後に, 各試験区から20尾を新たな水槽に移し, 実験Ⅰと同様の手順で WSSV による攻撃を行った。

実験Ⅲ. 感染防御効果の免疫様記憶

実験Ⅰで rVP26, rVP28, 大腸菌タンパク質, あるいは PBS を経口投与した各区のクルマエビを本実験にも供した。初回ワクチン投与により誘導された WSSV に対する感染防御能が完全に消失した時期, すなわち初回投与から104日後に, 各ワクチン投与区より各々 100尾のクルマエビを210 L 容量の FRP 製水槽4つにそれぞれ分槽し, 初回投与と同じタンパク質を含む配合飼料を5日間追加投与した。初回投与から 112, 119, 126および135日目 (追加投与から8, 15,

22および31日目) に, 各区より20~25尾ずつ新たな水槽に移し, 実験Ⅱと同様の方法で WSSV による攻撃を行った。

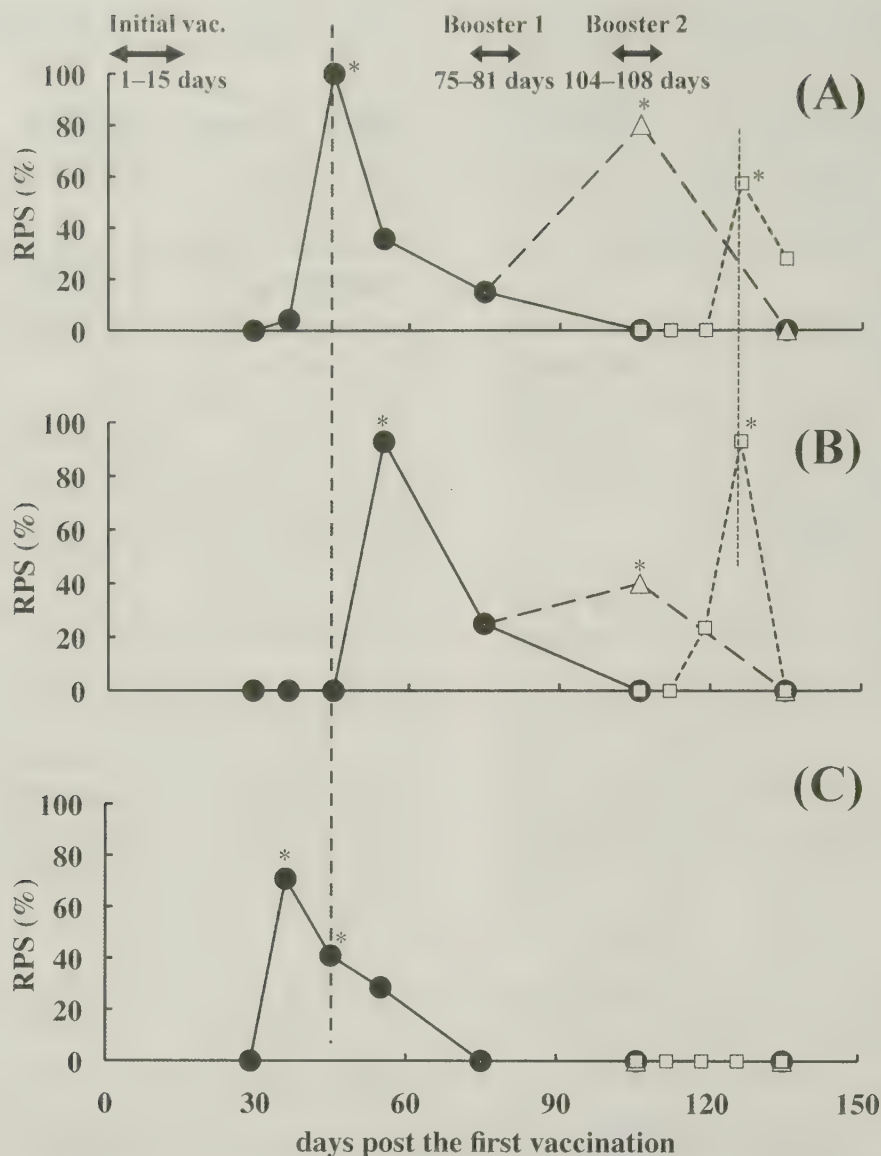
実験Ⅳ. 感染防御効果の特異性

次に新たなクルマエビ飼育群 (平均体重0.08g) を 210 L 容 FRP 製水槽 3 つに500尾ずつ収容し, 実験Ⅰと同様 rVP26, rVP28あるいは PBS を含む配合飼料を15日間給餌した。ワクチン投与量および投与法は, 全て実験Ⅰと同様に行った。初回投与開始から35, 45, 55および106日後に, 各区より20~25尾を新たな水槽に分槽し, 実験Ⅰと同様に WSSV 攻撃試験を実施し, 初回投与による WSSV に対する感染防御能が一度上昇した後, 減衰したことを確認した。さらに, 初回投与開始から106日目に, 初回 rVP26投与群から 210 L 容 FRP 水槽に2つに60尾ずつ分槽し, 一方には rVP26含配合飼料を (rVP26-rVP26区), 他方には rVP28含配合飼料 (rVP26-rVP28区) を各々 7日間追加投与した。同様に, 初回 rVP28投与群からも60尾ずつを2水槽に分槽し, 一方に rVP26含配合飼料を (rVP28-rVP26区), 他方には rVP28含配合飼料を (rVP28-rVP28区) を各々 7日間追加投与した。なお, 対照として, 初回 PBS 含配合飼料投与群より60尾を分槽し, PBS 含配合飼料を追加投与した。さらに,

Table 11. Cumulative mortality and relative percentage survival (RPS) in kuruma shrimp vaccinated with WSSV rVP26, rVP28 and *E.coli* proteins by WSSV challenge at different times after the initial vaccination

Initial Vac.		Days after initial vaccination									
1-15 d		29 d	36 d	45 d	55 d	75 d	106 d	112 d	119 d	126 d	135 d
Experiment I	rVP26	Cum. Mort. (%) ^{*1}	92	92	0 ^{*3}	45	68	60			96
		RPS (%) ^{*2}	0	4	100	36	15	0			0
	rVP28	Cum. Mort. (%)	96	96	88	5 ^{*3}	60	72			84
		RPS (%)	0	0	0	93	25	0			0
	<i>E. coli</i>	Cum. Mort. (%)	92	28 ^{*3}	52 ^{*3}	50	96	72			75
		RPS (%)	0	71	41	29	0	0			0
	PBS	Cum. Mort. (%)	84	96	88	70	80	60			70
	rVP26	Cum. Mort. (%)					15 ^{*3}				76
		RPS (%)					80				0
Experiment II	rVP28	Cum. Mort. (%)					45 ^{*3}				79
		RPS (%)					40				0
	<i>E. coli</i>	Cum. Mort. (%)					75				71
		RPS (%)					0				0
	PBS	Cum. Mort. (%)					75				71
Experiment III	rVP26	Cum. Mort. (%)						85	90	30 ^{*3}	65
		RPS (%)						0	0	57	24
	rVP28	Cum. Mort. (%)						95	65	5 ^{*3}	88
		RPS (%)						0	24	93	0
	<i>E. coli</i>	Cum. Mort. (%)						75	85	75	92
		RPS (%)						0	0	0	0
	PBS	Cum. Mort. (%)						65	85	70	86
	rVP26	Cum. Mort. (%)									
		RPS (%)									

*1: Cumulative mortality (%)
*2: Relative percent survival (%) in each group versus PBS group
*3: Significantly different (1% level) from the PBS groups by χ^2 test



(A): rVP26, (B): rVP28, (C): *E. coli* proteins; RPS of the shrimp with initial vaccination (●), with booster 1 (△), with booster 2 (□). * $p < 0.01$: from the cumulative mortality

Fig. 18. Time-dependent changes of relative percent of survivor (RPS) against WSSV challenge in kuruma shrimp vaccinated with WSSV rVP26, rVP28 or *E. coli* proteins.

初回投与から113日目に、各区から20尾ずつ新たな水槽に分槽し、実験Iと同様の手順でWSSVによる攻撃試験を行い、各ワクチン投与区の累積死亡率の推移を30日間観察した。

(4) 有意差検定および相対生残率

有意差検定および相対生残率は、第3章と同様の方法で行った。

3. 結果

実験I. WSSVに対する感染防御効果の発現および持続期間

rVP26, rVP28, 大腸菌タンパク質およびPBSを経口投与したクルマエビをWSSVで攻撃した際の累積死亡率をTable 11に、またrVP26, rVP28および大腸菌タンパク質投与区のPBS投与区に対する相対生残率(RPS)をTable 11およびFig. 18に示した。

rVP26投与区のWSSVに対する感染防御能は、初回投与36日目から認められ、45日目に最高値(100

%, 累積死亡率0%, $P < 0.01$) に達し, その後減衰し75日目まで持続したが, 106日目以降では WSSV に対する防御能は全く認められなかった。rVP28投与区では, 初回投与から55日目に認められると同時に最高値 (93%, 累積死亡率5%, $P < 0.01$) に達し, その後 rVP26投与区と同様の経過が観察された。一方, 大腸菌タンパク質投与区では, 初回投与から36日目に認めら始めると同時に最高値 (71%, 累積死亡率28%, $P < 0.01$) に達し, 55日目まで持続したが, 75日目以降では防御反応を観察できなかった。なお, PBS 含配合飼料投与区での累積死亡率は, 106日目の攻撃試験で60%と若干低かったものの, その他の攻撃試験では70-96%と安定していた。

これらの結果から, rVP26投与区の感染防御能のピークは, rVP28投与区に比べ若干早いことが明らかになった。また, 大腸菌投与区でも WSSV に対する感染防御能が認められたが, そのピークは rVP26あるいは rVP28投与区に比べさらに早い時期に認められた (Fig. 18-A)。また, rVP26あるいは rVP28を15日間経口投与した際に誘導される WSSV 感染防御能は, 30~40日程度しか持続しないことが明らかになった。

実験Ⅱ. 経口ワクチンの追加投与効果

rVP26を投与したクルマエビに初回投与から75日目に rVP26を5日間追加投与し, 初回投与から106日および135日目に WSSV で攻撃した結果, 106日目に高い感染防御能 (RPS: 80%, 累積死亡率: 15%) が認められたが, 135日目には感染防御能は認められなかった (RPS: 0%, 累積死亡率: 76%) (Table 11, Fig. 18)。rVP28を投与したエビに rVP28を追加投与した場合でも同様に, 106日目に感染防御能が認められたが (RPS: 40%, 累積死亡率: 45%), 135日目には認められなかった (RPS: 0%, 累積死亡率: 79%) (Table 11, Fig. 18)。rVP26あるいは rVP28を追加投与した区で106日目に認められた感染防御能は, 追加投与前 (実験Ⅰ区75日目) および非追加投与区 (実験Ⅰ区106日目) と比べ明らかに高く, 追加投与により WSSV 感染防御能が上昇することが明らかになった。しかしながら, 各追加投与により上昇した感染防御能は, 初回投与より135日目 (追加投与より60日目) には完全に消失していた。一方, 大腸菌タンパク質を初回および追加投与したクルマエビでは, 106日目および135日目の累積死亡率は, 75% (RPS: 0%) および71% (RPS: 0%) となり, 追加投与による感染防御能の上昇は認められなかった。なお, PBS 追加投与区の累積死亡率は, 何れも71%以上であった。

実験Ⅲ. 感染防御効果の免疫様記憶

初回ワクチン投与により誘導された感染防御能が

完全に消失した時期, すなわち初回投与から104~108日目に実験Ⅱと同様に追加免疫を行い, 追加投与による感染防御能の変化を表10および図15に示した。rVP26を追加投与した区では, 112日目 (追加投与8日目) および119日目 (追加投与15日目) の攻撃で感染防御能は認められなかったが, 126日目 (追加投与22日目) の攻撃では RPS が57% (累積死亡率30%) となり, 比較的高い感染防御能が認められた。しかし, 135日目 (追加投与31日目) の攻撃では, RPS は24% (累積死亡率65%) となり, 感染防御能は126日に比べ減衰していた。

rVP28を追加投与した区では, 112日目 (追加投与8日目) の攻撃で感染防御能は認められなかったが, 119日目 (追加投与15日目) の攻撃で感染防御能が認められ始め (RPS: 24%), さらに126日目 (追加投与22日目) の攻撃では RPS が93% (累積死亡率5%) となり, 高い感染防御能が認められた。しかし, 135日目 (追加投与31日目) の攻撃では, 感染防御能は消失していた。

大腸菌追加投与区では, 112~135日目の攻撃で何れも RPS は0% で, 追加投与による WSSV に対する感染防御能は認められなかった。なお, PBS 追加投与区の累積死亡率は, 何れも65%以上であった。

実験Ⅳ. 感染防御効果の特異性

rVP26あるいは rVP28を経口投与し, さらに同種あるいは異種タンパク質を追加投与した場合の WSSV 感染防御能の推移を Table 12に示した。まず, rVP26あるいは rVP28を経口投与し35日, 45日, 55日および106日目に WSSV により攻撃を行ったところ, 35日および45日目の攻撃では感染防御能は認められなかったが, 55日目の攻撃で WSSV 感染防御能が上昇し (rVP26投与区の RPS: 72%, rVP28投与区の RPS: 59%), さらに106日目の攻撃では感染防御能が減衰あるいは消失していた。

次いで, 初回投与106~112日目に初回投与ワクチンと同種あるいは異種タンパク質を追加投与し, 初回投与から113日目 (追加投与7日目) に WSSV 攻撃を行った。その結果, rVP26投与区に rVP26を追加投与した場合 (rVP26-rVP26) の RPS は100%であったのに対し, 同区 rVP28を追加投与した場合 (rVP26-rVP28) の RPS は33% で, 同種抗原を追加投与した場合の RPS は異種抗原を投与した場合に比べ明らかに高かった。また, rVP26-rVP26区の RPS は追加投与直前の RPS (21%) に比べ明らかに高かったが, rVP26-rVP28区と追加投与直前の RPS に有意な差異は認められなかった。一方, rVP28投与区に rVP26あるいは rVP28を追加投与した場合, rVP28-rVP26およ

Table 12. Booster effect of homologous and heterologous rVPs in shrimp phylaxis induced by oral vaccination with recombinant WSSV proteins, rVP26 and rVP28

		Days after initial vaccination							
		Initial Vac. 1-15 d	35 d	45 d	55 d	106 d	Booster Vac. 106-112 d	113 d	
Experiment IV	rVP26	Cum. Mort. (%) ^{*1}	80	87	24 ^{*3}	55	rVP26	Cum. Mort. (%)	0 ^{*3}
		RPS (%) ^{*2}	11	0	72	21	rVP28	RPS (%)	100
							rVP28	Cum. Mort. (%)	30
							rVP28	RPS (%)	33
	rVP28	Cum. Mort. (%)	87	87	36 ^{*3}	90	rVP26	Cum. Mort. (%)	26
		RPS (%)	3	0	59	0	rVP26	RPS (%)	42
							rVP28	Cum. Mort. (%)	15 ^{*3}
							rVP28	RPS (%)	67
	PBS	Cum. Mort. (%)	90	80	88	70	PBS	Cum. Mort. (%)	45

*1: Cumulative mortality (%)
*2: Relative percent survival (%) in each group versus PBS group
*3: Significantly different (1% level) from the PBS groups by χ^2 test

び rVP28-rVP28 の RPS は、各々 42% および 67% で、先と同様に同種ワクチンを追加投与により誘導された感染防御能の方が、異種ワクチンを追加投与に比べ高いことが明らかになった。さらに、rVP26 追加投与区である rVP26-rVP26 区 (RPS: 100%) と rVP28-rVP26 区 (RPS: 42%) を比較した場合、同じ rVP26 を追加投与したにもかかわらず同種ワクチン投与区の RPS が異種ワクチン投与区の RPS の 2 倍以上高いものであった。逆に、rVP28 追加投与区で比較しても同様に、rVP28-rVP26 区 (RPS: 33%) の感染防御能は、rVP28-rVP28 区 (RPS: 67%) に比べ 2 倍以上高かった。

4. 考 察

実験 I の結果から、rVPs をクルマエビに経口投与した場合、WSSV に対する感染防御能は、投与 45-55 日目に出現し、その後 20~30 日間維持されることが明らかになった (Fig. 18-A, B)。Namikoshi *et al.* (2004) は、rVPs をクルマエビに筋肉注射投与した場合、WSSV に対する抵抗性は接種 30 日目を以降に確認されることを報告している。また、WSSV 感染体過エビの場合では、WSSV に対する抵抗性は感染後 3 週目から出現し、その後約 2 か月間持続されたとしている (Wu *et al.* 2002)。したがって、クルマエビの場合は、ワクチンの投与方法にかかわらず、WSSV 感染防御能の誘導に約 20~30 日程度必要であると考えられる。しかし、rVPs により誘導された感染防御能の持続期間は、感染耐過エビで認められた防御能に比べ明らかに短いことが示唆された。一方、ウシエビに rVP28 を経口投与した場合、投与後 7 日目に最も高い防御効果が確認され (Witteveldt *et al.*, 2004)、また体重

5g のホワイトレッグシュリンプでも同様に、投与後 7 日目に高い防御反応が観察されている (Witteveldt *et al.*, 2006)。この様に、rVPs 経口投与により誘導される感染防御能の時期は、クルマエビとその他のエビ類では大きく異なるように見えるが、実際には、供試エビの種類のみでなく、体重、接種抗原の種類、接種方法あるいは飼育水温等の条件が実験結果に大きく影響すると考えられる。特に体重は、防御反応の誘導時期に影響する最も重要な要因の一つであると考えている。なぜなら、予備的な実験ではあるが、平均体重 0.1 g、0.8 g および 2.5 g のクルマエビに rVP26 を経口投与した場合、0.1 g および 0.8 g のエビでは rVP26 投与後 45 日目まで感染防御能が認められなかったが、0.8 g のエビでは投与後 36 日で検出され、サイズの大いエビの方が速やかに感染防御能が出現する傾向が認められている。

実験 I において、rVPs の経口投与による防御効果の持続期間は 20~30 日間であり、感染耐過エビに比べ短いことが明らかになり、養殖現場での rVPs 経口ワクチン使用を想定した場合、大きな課題が残された。そこで、実験 II では、rVPs の追加投与により感染防御効果への影響を検証した。実験 II では、rVPs 初回投与による WSSV 感染防御能のピークが過ぎ減衰したものの、まだ防御能が残存する時期、初回投与 75~81 日目に追加投与を行った (Table 11, 実験 I, 75 日)。その結果、初回投与後 106 日目の攻撃試験で、非追加投与区に比べ明らかに高い感染防御能が確認された (Table 11)。本感染防御能は、追加投与直前の感染防御能と比較しても明らかに高かったことから (Table 11)、rVPs を追加投与することで WSSV 感染防御能

を維持することが可能であると考えられる。しかしながら、初回投与から135日目（追加投与より60日目）に行った WSSV 攻撃試験において、rVPs 追加投与区のエビに WSSV 感染防御能が認められなかったことから、追加投与により WSSV 感染防御能の持続期間を延ばすことが可能であるが、追加投与により延びる持続期間は比較短く、WSSV 感染防御能を維持し続けるためには少なくとも30～40日毎にrVPsを追加投与する必要があると考えられる。

実験Ⅲでは、rVPsの初回投与により誘導された WSSV 感染防御能が完全に消失した時期、すなわち初回投与から104～108日目にrVPsを追加投与し、感染防御能の推移を観察した。その結果、rVPsを追加投与した区では、追加投与直後（初回投与112日目、追加投与8日目）の攻撃で感染防御能は認められなかったが、119～126日目（追加投与12-15日目）の攻撃で高い感染防御能（rVP26追加投与：57%、rVP28追加投与：93%）が認められた。しかしながら、135日目（追加投与31日目）の攻撃で、WSSV 感染防御能が既に大幅に減衰あるいは消失していることが明らかになった（Fig. 18）。残念ながら、初回非投与群を設けていなかったことから、rVPs 追加投与による感染防御能の出現時期について正確に比較することは出来ないが、追加投与による感染防御の誘導（約12～15日前後）は初回投与（約30日前後）に比べ速い可能性が示唆された。また、先にも述べた如く、追加投与による感染防御能の持続期間は、初回投与あるいは感染耐過エビに比べ、明らかに短いことが再確認された。

ところで、Namikoshi *et al.* (2004) は、クルマエビにrVPsを筋肉内注射により追加投与することで、WSSV に対する感染防御能が亢進することを報告している。本実験結果では、初回投与による感染防御能がRPS 93% 以上と高かったこともあり、残念ながら追加投与により感染防御能の亢進は認められなかったが、追加投与による感染防御の誘導が速まる傾向が認められた。これらの現象は、脊椎動物における免疫の二次応答に極めて類似した現象である。無脊椎動物であるエビ類は抗体を持たないことから、狭義の免疫はないと考えられてきた。しかしながら、WSSV 感染耐過エビが WSSV 再感染に抵抗性を示す、いわゆる免疫様現象が発見され（Venegas *et al.*, 2000）、rVPs を投与することで WSSV 感染防御能が誘導されること（Wu *et al.*, 2002）、さらにはrVPsを追加投与により感染防御能が持続されることは、エビ類にも免疫反

応に類似した感染防御機構が備わっている可能性を示唆する結果であると考えられる。

そこで実験Ⅳでは、rVPs 投与により誘導される WSSV 感染防御能の特異性について検討するために、初回投与と同種あるいは異種のrVPsを追加投与した場合の感染防御能の変化について検討した（Table 12）。その結果、同種rVPsを追加投与した場合（rVP26-rVP26およびrVP26-rVP26）のRPSは、異種rVPsを追加投与した場合（rVP26-rVP28およびrVP28-rVP26）に比べ明らかに高く、また追加投与直前と比べても感染防御能が亢進していることが明らかになった。さらに、rVP26追加投与区であるrVP26-rVP26区（RPS: 100%）とrVP28-rVP26区（RPS: 42%）とを、またrVP26追加投与区であるrVP26-rVP28区（RPS: 33%）とrVP28-rVP28区（RPS: 67%）とを比較した場合、同じrVP26あるいはrVP28を追加投与したにもかかわらず同種ワクチン投与区のRPSが異種ワクチン投与区の2倍以上高いことが明らかになった。一方、予備的に行った試験では、WSSV 感染防御能を誘導されたクルマエビは、ビブリオ感染に対する防御能を示さなかったこと、WSSV 感染防御能を誘導されたクルマエビの血リンパ上清中には、WSSV を中和する活性が認められること、さらに本血リンパ液は他の魚類病原ウイルスであるinfectious hematopoietic necrosis virus (IHNV)、viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) およびinfectious pancreatic necrosis virus (IPNV) を中和することができなかった（Wu, 2003 博士論文）^{*5}。これらの結果は、クルマエビがrVP26とrVP28を異なるタンパク質として認識している可能性を示唆するものであり、さらに先の実験では明らかにできなかった同種rVPを追加投与することで、WSSV 感染防御能が亢進されることを示す結果であると考えられる。すなわち、クルマエビも、抗体こそ持たないが、脊椎動物の免疫に相当する生体防御機構を備えている可能性があると考えられる。

ところで、本研究で大腸菌タンパク質を経口投与したクルマエビにおいても、WSSV 感染防御能が認められた。これまでの研究で、ペプチドグリカン、 β -1,3-グルカンもしくはリポ多糖体（LPS: lipopolysaccharide）の経口投与によって誘導される感染防御反応は、細菌感染のみならず（Sun *et al.*, 1994; Teunissen *et al.*, 1998; Sritunyalucksana *et al.*, 1999）、WSSV に対しても効果が認められている

*5 Wu, J. L., 2003. Studies on quasi-immune response of kuruma shrimp *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus (WSSV). Applied Biological Science, Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, Doctoral Thesis 62-81.

(Itami *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2000)。また最近, β -1,3-グルカンおよびLPSに対する結合タンパク質遺伝子が *P. monodon* (Luo *et al.*, 2006) および *L. schmitti* (Cominetti *et al.*, 2002) からクローニングされ, さらに Toll 受容体遺伝子が *L. vannamei* (Yang *et al.*, 2007) から単離されている。本実験結果において, 大腸菌タンパク質投与区では, 感染防御能のピーク (RPS 値71%) が投与後36日目から認められおり, rVPs 投与区のピークに比べ10~20日程早かったこと (実験 I), さらに大腸菌タンパク質の追加投与による効果は一切認められなかったことから (実験 II, III), 大腸菌タンパク質により誘導された WSSV 感染防御能は, rVPs により誘導された感染防御能とは異なる機序によって誘導されたのではないかと考える。

総合考察

クルマエビ種苗生産過程における WSSV の防除対策の現状を Fig. 8 に模式的に示した。種苗生産に供する受精卵を確保するのに必要な雌親エビの養成技術はまだ確立されていない。採卵用の成熟した親エビは, ほとんどの場合天然由来の親エビに依存している。天然親エビが WSSV に感染していれば, 種苗生産現場にウイルスを持ち込むことになり, 飼育過程における WSD 発生の危険性が高くなる。また, 天然海域に生息する甲殻類や海水を介しての水平的な伝播が起こる可能性がある。従って, 種苗生産場へ WSSV を持ち込まないために感染経路の遮断を中心とした防除対策の構築が求められる。現在では, 産卵に供試した親エビの PCR 法による WSSV 検出結果に基づくウイルス陽性エビの排除と受精卵のヨード剤による消毒の実施, および飼育用水の殺菌を中心とした防除対策を講じることにより, WSSV フリーの種苗を確保する技術が確立した。次のステップとして, クルマエビの免疫様現象を利用した水平感染防除対策の構築が可能となれば, ウイルスフリーの種苗の有効利用につながるとともにクルマエビにおける WSD の総合的な防除対策の構築が可能となる。本研究第1章および2章においてクルマエビ種苗生産における WSD の発生状況と垂直感染の防除を中心とした防除対策の効果について検討した。第1章では種苗生産過程における WSD の発生状況の詳細な検討により, WSSV の主たる感染経路の推定を行った。また, 第2章ではポビドンヨード剤による安全で効果的な受精卵の消毒条件を把握する目的で, クルマエビ受精卵に対する安全濃度, 消毒処理時間および消毒効果について検討した。

前述の如くウイルスフリーの種苗を生産する技術を

確立したが, 飼育環境をウイルスフリーの状態に保つことが困難な育成段階における水平感染対策は, これまで無策であった。しかし, クルマエビにおける免疫様現象の発見により (Venegas *et al.*, 1999), エビ類においても十分に免疫様現象を利用したワクチン技術の開発が可能であると考えに至った。第3章では, rVPs の経口投与による WSSV 攻撃への防御効果を注射, 浸漬および経口攻撃によって検討した。第4章では, 防御効果の発現時期, 持続期間および追加投与効果について検討し, 経口ワクチンによる水平感染対策の構築を目的として研究に取り組んだ。

ここでは, これまでの結果を総合的にとりまとめ, クルマエビの WSSV 防疫対策の展望について考察する。

第1章において, 1996年以降の志布志庁舎における種苗生産過程の WSD の発生状況を検討した。その結果, 産卵親エビの卵巣から WSSV が検出されたこと, これらの PCR 陽性個体由来の受精卵を排除したところ, 種苗生産の成功事例は23事例中21事例 (91.3%) になり, WSSV の防除効果を確認できる結果が示され (Table 13), 親エビにおける WSSV の検出結果と種苗からの WSSV の検出および WSD の発生が良く符合した。また, WSSV 陽性の親エビを排除した種苗生産での成功率の上昇から, 種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は親エビからの垂直伝播と考えられた (佐藤ら, 1999)。虫明ら (1998) は, 1996年7月から1998年4月までに国内主要漁場で漁獲された天然親エビ合計1,269尾 (雌955, 雄314) の9.2%から WSSV を検出し, 検出率は, 夏期 (7月から8月) に漁獲される親エビで高まる傾向がみられ, 反対に4月から6月にかけて漁獲される雌親エビでは低い傾向があったとした。これとは別に, 2002年から2007年までの実際の種苗生産において採卵に供試された雌親エビ6,312尾からの WSSV 検出状況の推移を Fig. 19 に示した。2002年に東海沿岸および九州東岸2の海域で50%に達する検出率を示した後, 2003年以降15.0%の検出率を最高にほぼ10%前後で推移し, 検出される地域が特定の場所に偏った傾向がみられるとともに, 7月あるいは8月頃に検出されやすい傾向がみられた。天然海域での棲息個体から WSSV が検出されることはウシエビ (Lo *et al.*, 1997) やヨシエビ (Wang *et al.*, 1997) でも報告され, ウシエビでは産卵期である夏から秋の漁獲個体の方が冬の漁獲個体より検出率が高くなることが報告されている。この現象はクルマエビと同様であり, クルマエビにおいては多回産卵がストレッサーとなって, 親エビに不顕性感染している WSSV の増殖を誘発することに起因すると考えら

れている (Mushiake *et al.*, 1999)。このような検出率に季節的な変動が起こる現象を踏まえ、種苗生産においては、WSSV の感染率が比較的低い4月から6月に漁獲される親エビを搬入し、それらの親エビから得られた卵を飼育に用いることも WSSV の防除対策の一つとして有効とされている (虫明ら, 1998)。また、1997年から1999年の3年間における、親エビの産卵前後の卵巣卵および受精囊 (交尾により雄から獲得した精子を貯蔵しておく小囊) からの WSSV 検出率を比較すると、卵巣卵および受精囊のいずれも産卵前より

産卵後の方が検出率が高く、また、産卵後の検出率は卵巣卵より受精囊の方が高くなっている (Table 13) (Mushiake *et al.*, 1999)。以上の結果から、親エビの WSSV 検出結果に基づく受精卵の選別を行う防除対策においては、産卵後の受精囊を検査部位に選択することが重要であると考えられる。

Fig. 19に示した天然クルマエビの WSSV 検出状況の調査において、2002年から2003年にかけて検出率の低下とともに四国東岸での検出率が比較的高く推移した。いずれについても要因は不明であるが、九州東岸

Table 13. Occurrence of WSD at Shibushi and Kamiura station of JASFA in 1996 to 2000

Year	Selection of spawnres ^{*1}	Disinfection treatment of eggs	No. of successes / conducted
1996	Not done	Not done	6/14 (42.9%)
1997	From ovary pre-spawning	Iodine	21/23 (91.3%)
1998	From R. S. ^{*2} after spawning	Iodine	11/11 (100%)
1999	From R. S. after apawning	Iodine	16/16 (100%)
2000	From R. S. after apawning	Iodine	20/21 (95.2%)

^{*1} Selection based on PCR results.
^{*2} R. S. :receptaculum seminis.

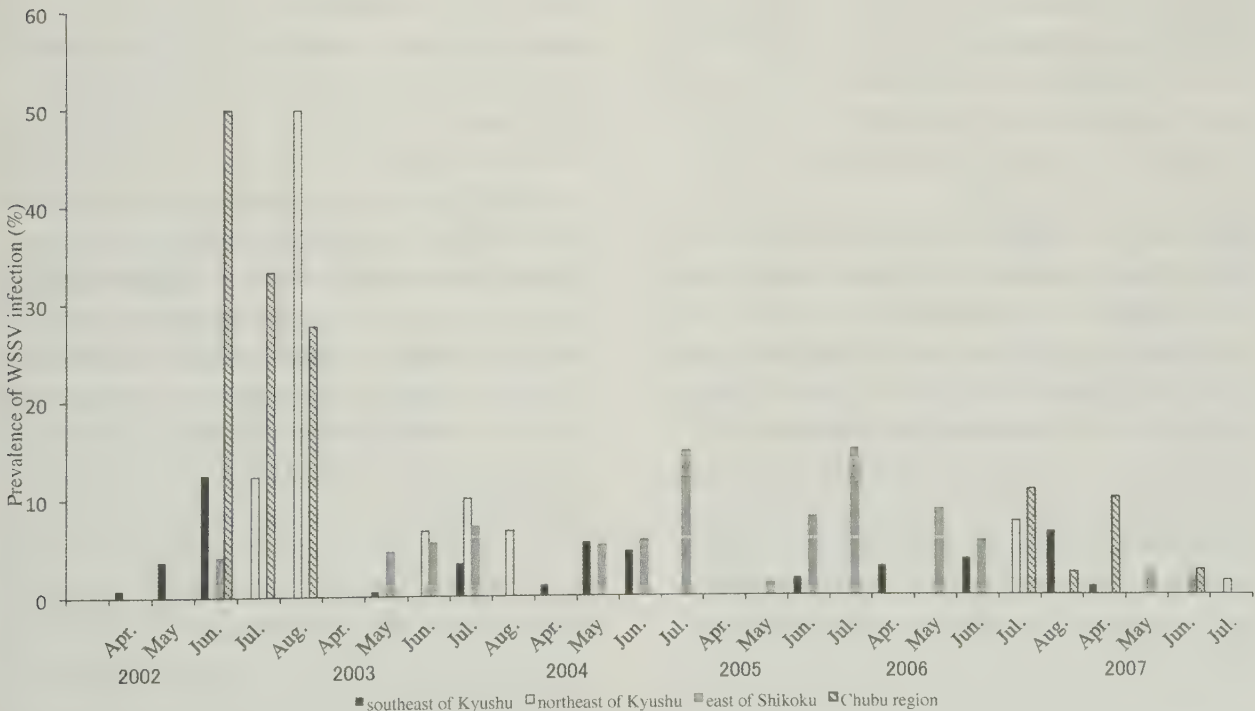


Fig. 19. Seasonal change of prevalence of WSSV in wild female kuruma prawn caught from each major landing places in Japan.

海域で検出率が低下した要因の一つとして病原体と宿主の平衡関係の成立が考えられる。室賀（2000）は、オーストラリアの野ウサギの撲滅に用いたミクスーマウイルスとの平衡関係成立までの世代数でみると6世代かかったとされる事例から、国内のニジマス（1世代が3年）におけるIPN（伝染性脾臓壊死症）の発症（1964年頃）から終息まで（20年弱）の事例とも良く符合し、病原体と宿主の平衡化が流行の終息に関わっている可能性を論じている。クルマエビのWSDが発生するようになった1993年から現在までに15年経過し、クルマエビの1世代を2年とすれば7世代が、3年とすれば5世代が経過したと考えられ、クルマエビとWSSVの平衡化が起こっているかもしれない。WSDが国内で発生後、WSSVは天然の甲殻類から検出あるいは分離されていることから、このウイルスは国内に定着したものと考えられる。天然クルマエビの検出率が低下傾向にある地域もあるが、継続して検出される地域も存在し、天然の甲殻類にいかにしてWSSVの感染が定着していったのか、天然海域におけるWSSVの感染環境については興味深いところである。魚類のベータノダウイルスにおいては、分子疫学的な調査手法により天然マアジから検出されるベータノダウイルスの遺伝的多様性が調べられ、天然マアジ間でのベータノダウイルスの伝播に地理的・季節的要因が関係していると考えられている（菅谷ら、2007学会発表）^{*6}。WSSVの検出状況においても地理的あるいは季節的な変動がみられることから（Fig. 19）、このような、分子疫学的手法によるデータの蓄積を行うことで、天然域でのWSSVの分布および動体を把握することが可能となれば、流行予測という観点から、より高度なWSSV防除対策の構築が可能となると考える。

前述のように、種苗生産過程でのWSDの発生状況から、WSSVの感染経路として垂直伝播が強く示唆され、産卵後の親エビ受精嚢を検査し、陰性と判定された親エビ由来の卵のみを選別して種苗生産を実施したところ、Table 13に示したように1998年から2000年までのクルマエビ種苗生産の成功率は97.9%となった。したがって、親エビの受精嚢検査に基づく卵選別と次項目で述べる卵消毒とを組み合わせた方法は、種苗生産過程におけるクルマエビのWSSV防除対策として極めて有効であると考えられる。しかし、48事例中わずか1例ではあるが種苗からWSSVが検出され、WSDの発生には至らなかったものの、種苗生産を中

止せざるを得ない事例があった。その後、この原因は、産卵後の受精嚢はPCR陰性であったが、卵巣がPCR陽性の個体が含まれていたことが判明し（虫明ら、未発表）（Table 14）、産卵後の受精嚢検査結果だけにに基づく卵の選別では、WSSVの検出漏れを起こすことが判明した。この検出漏れを防ぐには、1個体について卵巣卵と受精嚢の2部位を検査することが必要になるが、コストおよび検査時間の延長など問題点があることから、最も現実的な防除対策として、親エビのPCR陽性率が低い4月から6月の比較的早い時期に漁獲される親エビを用い、産卵後の受精嚢からのWSSV検出結果に基づく受精卵の選別が有効かつ効率的であると考えられる。

WSSVがクルマエビ受精卵に侵入するのか、単に表面に付着しているだけなのかについては明らかではない。また、受精卵の消毒に関しても、今のところ効果を厳密に確認した例は報告されていない。台湾におけるウシエビのWSDでは興味深い報告がある。WSSVが卵巣卵内に存在すると卵の発育が阻害され、垂直伝播が起これないと言われている。しかし、この場合でも、卵およびふ化幼生については洗浄または消毒を実施することが有効な垂直伝播の防除になっている（Lo *et al.*, 1997）。志布志庁舎では、受精卵の卵表面に存在するウイルスを不活化することを目的として、1997年以降、ヨード剤（有効ヨウ素濃度5 mg/L）を含む紫外線処理海水で5分間の消毒を行っている。最近の研究報告では、WSSVは有効ヨウ素濃度2.5 mg/L以上では0.2分以内、1.0 mg/Lでは2分以内に不活化されると言われていることから（桃山、谷村、2004）、上述の消毒条件は十分に受精卵表面のWSSVを不活化できているものと推定される。さらに、第2章で述べたように受精卵の発育段階が128細胞期以外の段階に有効ヨウ素濃度の減衰が起これないことが確認された卵密度（0.33 g/L）で有効ヨウ素濃度2.5および5.0 mg/Lで5分間の消毒処理により、ヨードを含まない海水で消毒操作のみを行った対照区の正常ふ化率と遜色ない正常ふ化率が得られることが確認され、安全かつ効果の期待できる卵消毒方法であると考えられる（佐藤ら、2006）。

種苗生産過程におけるWSDの発生には、WSSVの親エビからの垂直伝播のほか、水平伝播も重要な要因の一つと考えられる（佐藤ら、2003）。特に高密度の飼育環境下では、共食いや飼育水を媒介とした水平感染が容易に成り立つことが報告されている（Wu

*6 菅谷琢磨、森広一郎、西岡豊弘、沖中 泰、中井敏博、池田和夫、2007. 天然マアジから検出されたベータノダウイルスの遺伝的多様性、平成19年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 p. 37.

Table 14. Prevalence of WSSV in ovary and receptaculum seminis of kuruma prawn spawners by nested PCR before and after spawning during 1997-1999

Date of		Prevalence of WSSV (%)			
purchase		Ovary		Receptaculum seminis	
year	month	Pre-spawning	Post-spawning	Pre-spawning	Post-spawning
1997	Apr.	1.6(4/248) ^{*1}	3.4(3 / 87)	NE ^{*2}	NE
	May	0(0/ 81)	0(0/ 40)	NE	NE
	Jun.	0(0/108)	0(0/ 37)	0(0/ 38)	2.3(2/ 86)
	Jul.	0.7(2/297)	4.0(4/101)	8.6(6/ 70)	39.2(83/212)
	Aug.	1.3(3/240)	10.0(10/100)	5.7(2/ 35)	52.6(41/ 78)
	Total in 1997	0.9(9/974)	4.7(17/365)	5.6(8/143)	33.5(126/376)
1998	Mar.	0(0/ 3)	0(0/ 18)	0(0/ 3)	0(0/ 18)
	Apr.	0(0/ 38)	0(0/587)	0(0/ 38)	1.4(8/587)
	May.	0(0/ 13)	0.9(1/111)	0(0/ 13)	0.9(1/111)
	Jun.	0(0/ 13)	1.6(2/122)	0(0/ 13)	13.9(17/122)
	Jul.	0(0/108)	1.4(2/148)	0(0/ 21)	24.3(36/148)
	Total in 1998	0(0/175)	0.5(5/986)	0(0/ 88)	6.3(62/986)
1999	Mar.	0(0/ 15)	0(0/181)	0(0/ 15)	0(0/181)
	Apr.	0(0/ 10)	0(0/262)	0(0/ 10)	0(0/262)
	May.	0(0/ 5)	0(0/ 39)	0(0/ 5)	0(0/ 39)
	Jun.	0(0/ 10)	6.8(5/ 74)	0(0/ 10)	41.9(31/ 74)
	Jul.	0(0/ 7)	0(0/ 15)	14.3(1/ 7)	56.1(37/ 66)
	Total in 1999	0(0/ 47)	1.9(12/622)	2.1(1/ 47)	10.9(68/622)

^{*1}(PCR positive/examined).

^{*2} Not examined.

et al., 2001)。従って、予防措置として極端な高密度飼育を避け飼育環境に配慮する必要があるとともに飼育水槽間の器具の共用の禁止、エアレーションなどによる飛沫感染の防止等に注意を払う必要がある。これらの水槽や使用器具については、WSSVに有効な不活化効果のある薬剤が報告されているので（中野ら，1998；Chang *et al.*, 1998；Maeda *et al.*, 1998），用途に見合った消毒剤を使用すれば，容易に消毒は可能であると考え（Table 15）。

前述の如く，WSSV フリーの種苗を作る技術は確立したが，中間育成過程あるいは養殖漁業における種苗の育成環境は，自然環境に近い条件で行う場合が多く，前述の如く環境生物や飼育水からの水平伝播による感染が起こる可能性がある（Maeda *et al.*, 1998；Wu *et al.*, 2001；Momoyama, 2003）。ウイルス感染症

の水平感染対策の具体策は，薬剤での治療が困難であることから，養殖用種苗としては，ワクチンを利用する方法や SPR (specific pathogen resistant) 種苗の導入を図ることが最良と考えられる。Venegasu *et al.* (1999) によるクルマエビにおける免疫様現象の発見により，エビ類でも免疫抗原の投与によるワクチンに類似したウイルス感染症防除の確立が十分に期待できると考えられる。WSSV は株化細胞による培養ができないため，免疫抗原の効率的作成が困難であるが，大腸菌発現系等を用いた WSSV 構造タンパク質の発現精製が可能であり，現在では最も効率的な免疫抗原の作成方法の一つとして用いられている（Namikoshi *et al.*, 2004；Witteveldt *et al.*, 2004,2006；Jha *et al.*, 2006, 2007）。本研究では，WSSV の構造タンパク質である rVP26 (tegument タンパク質由来) およ

Table 15. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of WSSV

Treatment	Condition	Reference
Heat	≧ 1 minute at 60°C, ≧ 1hour at 50°C	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Dry	≧ 3 hours at 26°C	Maeda <i>et al.</i> (1998)
NaCl	≧ 24 hours at concentrations of 25%	Nakano <i>et al.</i> (1998)
UV	≧ 100,000μw・sec/cm ²	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Ozone-produced oxidants	≧ 1 minute at concentrations of 0.62mg/ l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Sodium hypochlorite	≧ 10 minutes at concentration of 1mg/l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Iodine	≧ 10minutes at concentrations of 2.5mg/ l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Trimethylammoniummethlenechloride	≧ 10 minutes at concentrations of 25mg/ l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Ethyl alcohol	≧ 1 minute at concentrations of 30%	Nakano <i>et al.</i> (1998)
Formalin	≧ 10minutes at concentrations of 5g/l	Nakano <i>et al.</i> (1998)
pH 3	≧ 60 minutes (25°C)	Chang <i>et al.</i> (1998)
pH 12	≧ 10 minutes (25°C)	Chang <i>et al.</i> (1998)
Duration of WSSV infectivity in sea water 15days (25°C)		Maeda <i>et al.</i> (1998)

びrVP28（エンベロープタンパク質由来）の経口投与による WSSV 防御効果を明らかにした (Sato *et al.*, 2008)。経口投与方法は、育成場へ導入する前のウイルスフリーの種苗に WSSV に対する抵抗性を付与する最も現実的で効率的な投与方法である。既に発現タンパク質を経口投与することで WSSV に対する防御反応を誘導した事例は前述の如く *Penaeus monodon*, *Litopenaeus vannamei* で報告されているが (Namikoshi *et al.*, 2004; Witteveldt *et al.*, 2004, 2006; Jha *et al.*, 2006, 2007), クルマエビにおける検討がなかったことから、本種における防御効果の誘導が確認できたことは意義深い。また、実際の育成環境で頻発するであろう共食いによる水平感染の拡大を想定した経口攻撃試験に対する強い防御効果の誘導についても確認ができた。

第 4 章において、誘導される WSSV 防御反応の発現時期、持続期間および追加投与の効果について調べた結果、rVPs の経口投与開始から約 35～45 日後に発現すること、その防御反応の持続期間が 10 日間程度であるが、rVPs を追加投与することで、防御効果を再度得られることを確認し、効果的な投与スケジュールの設計の可能性を示した (Sato *et al.*, 2009)。この実験結果のデータによれば、具体的には、発現時期のピークを挟んで前後 10 日間ほどである程度の防御効果が認められたことから、最初に確認された時点から 30～40 日間隔で追加投与を行うことで維持できる可能性

が示された。一方、rVP26 投与区にホモあるいはヘテロで追加投与した場合、ホモ追加投与区がヘテロ追加投与区に比較して、明らかに高い防御効果が認められた。この結果から、クルマエビに認められる免疫様現象には、改めて特異性と記憶が存在する可能性が考えられた。WSSV の VP26 および VP28 の抗原特異性については、家兎あるいはマウスを用いた *in vitro* 実験で調べられている。VP28 に対する家兎血清は WSSV を中和することが確認されたが (van Hulten *et al.*, 2001), VP26 に対するマウス由来の抗血清では WSSV を中和できなかったとされ (Xie and Yang, 2005), 何らかの感染に関わる抗原特異性を示すことが報告されている。クルマエビにおいて観察された、ヘテロ追加投与区で抵抗性が確認されなかったのは、クルマエビが抗原の特異性を認識した可能性が考えられた。今後、クルマエビにおいて免疫抗原に対する記憶や特異性の存在をメカニズムの面から明らかにすることができれば、より効率的な防御効果を誘導できるワクチン開発につながるデータになると考える。

Venegas *et al.* (2000) は、WSSV 感染耐過エビが WSSV 再感染に対し抵抗性を示す現象を「quasi-immune response (免疫様現象)」として説明しているが、これに対し Flegel (2007) は「Accommodation concept (適応概念)」を提唱し、甲殻類のウイルス感染に対する防御機構を説明しようとしている。「Accommodation concept」とは、宿主がウイルスに

対する免疫記憶等の特異的機能を働かせることで、宿主がウイルスの持続感染を許容し (Accommodaion: 適応)、結果的にウイルス感染により引き起こされる宿主細胞のアポトーシスが抑制されることで発症を抑えている、宿主と病原ウイルスの相互作用であると説明している (Flegel, 2007)。一般的に脊椎動物ではアポトーシスの一部の働きに、ウイルス感染細胞などの有害化した細胞を除去する生体防御反応が存在するとされる (永田ら, 2003)。事実、WSSV や yellow head disease virus (YHDV) に感染し死亡したウシエビにおいて、アポトーシス細胞が増加していたことが確認され (Wongprasert *et al.*, 2003; Khanobdee *et al.*, 2002)、また banana prawn ではアポトーシスに関連するカスパーゼ3プロテアーゼが発見され (Phongdara *et al.*, 2006)、アポトーシスがウイルス感染に対するエビ類の生体防御において重要な働きをしていると考えられる。しかし、Wu and Muroga, (2004) は、免疫様現象による WSSV 感染防御能の誘導の有無に関わらず、WSSV 攻撃により誘導されたクルマエビ体内のアポトーシス細胞数に顕著な差が認められなかったことから、アポトーシスはエビ類の免疫様現象に重要な役割を果たしていないこと述べている。しかし、アポトーシスを起こさない免疫様現象においても抵抗性の付与が液性因子によってもたらされることから (Wu *et al.*, 2002a; Wu and Muroga, 2004)、Venegas *et al.* (2000) の発見した免疫様現象を強く支持した。しかし、免疫様現象を裏付ける血リンパ液中の抗体様物質についての科学的な根拠が薄いことから、その機能解明について興味深いし、免疫様現象と同様の防御効果を誘導していると推察できるいくつかの報告においても防御効果の機能解明が行われることが大いに期待される。

最後に、産卵後の受精囊からの WSSV 検出に基づく受精卵の選別とヨード剤を用いた卵消毒とを組み合わせた方法は、種苗生産過程における WSD 防除対策に有効な方法であることが判明した。しかし、シーズン中にすでに産卵を繰り返している可能性がある夏期に漁獲される親エビにおいて WSSV 検出率の上昇がみられる傾向があることから、親エビで陽性率が上昇した際には、必要な受精卵数を確保できず種苗生産が困難になるケースも考えられる。そのためにも、前述した早い時期 (4~6 月) に漁獲される親エビから採卵を行うことも防除対策の一つになると考える。

中南米における *Penaeus vannamei* などの養殖業では IHNV (伝染性皮下造血器壊死症) や TS (タウラ症候群) 等のウイルス病対策として SPR (specific pathogen resistant) 種苗の導入が報告されている

(Lightner and Redman, 1998)。しかし、放流種苗生産のための親エビは遺伝的多様性も考慮に入れる必要があることから、放流水域から得られたものが妥当であり、そうすることにより、その水域にしばしば起こり得る疾病の生き残りを親として使用する可能性が高くなる (室賀, 2000)。さらに、安定した親エビの入手を確実にするためにも、このような天然親エビから得られた種苗からの採用用親エビの養成技術の開発が強く望まれ、ウイルスフリーの親エビ養成技術が確立されれば、垂直伝播の防除対策の最も大きな対策となり得るものと考えられる。そして、本研究で明らかになったように、あらゆる対策を総合的に講じることににより、WSSV 防除を図ることができると言える。

元来、抗体を持たない無脊椎動物のワクチン開発は無意味であると考えられてきたが、これまでの室賀らの研究により、感染耐過エビが再感染に対し抵抗性を獲得することなどが解明された (Venegas *et al.*, 1999)。この現象は脊椎動物の免疫現象に極めて類似した反応であり、クルマエビにおいても免疫様現象を利用して WSD の防除技術の開発が十分に可能であると考ええる。これまでに、クルマエビにおいては、WSD への防御反応を組換え大腸菌発現の WSSV タンパク質の筋肉注射投与によって誘導できることが報告されているが (Namikoshi *et al.*, 2004)、本研究では、実用性に優れた、組換えタンパク質の経口投与による WSSV 防御効果を明らかにし (Satoh *et al.*, 2008)、さらに誘導される防御反応の発現時期および持続期間について明らかにした (Satoh *et al.*, 2009)。今後は、この反応の機序の解明に関しても基礎データの収集を目的に実験に着手し、これらの研究から得られる免疫様現象を利用した防除に関する基礎データを応用し、増養殖過程におけるより積極的な WSSV 防除対策の構築を目指したいと考えている。

謝 辞

本論文をとりまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご助言そして本稿の校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野教授 吉水 守 博士に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり、旧日本栽培漁業協会当時からこれまでにわたり、実験計画の詳細な検討など終始懇切なるご指導ならびに本稿の校閲を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野准教授 西澤豊彦博士) (現韓国国立全南大学校水産生命医学科教授) に厚く感謝の意を表します。また、本論文の校閲の労を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野教授 五嶋聖

治博士、同海洋生物工学分野准教授 笠井久会博士に謹んで感謝の意を表します

本研究を遂行するにあたり、旧日本栽培漁業協会において当時の広島大学生物生産学部教授の 室賀清邦博士に共同研究者として有益な御助言を賜った。ここに記して感謝の意を表します。

本研究の機会を与えていただき、多くの便宜をはかっていただいた独立行政法人水産総合研究センターの 占澤 徹 元理事、今村茂生元理事、増養殖研究所 元所長 酒井保次博士、前所長 中野 広博士、現所長・元病害防除部長 飯田貴次博士、前業務推進部長 杜多 哲博士、業務推進部長 伊藤文成博士、前病害防除部長 佐野元彦博士、病害防除部長 乙竹 充博士に深謝の意を表します。

当初より本研究テーマに関わるチャンスを与えていただき、種々のご指導ご協力を頂くとともに当初より暖かい激励を頂いた水産総合研究センターの増養殖研究所 資源生産部長 有元 操博士、西海区水産研究所 まぐろ増養殖研究センター長 虫明敬一博士に心からお礼を申し上げます。

本研究にあたり、種々のご指導ご協力を頂きました増養殖研究所 病害防除部 種苗期疾病研究グループの 池田和夫元グループ長、同 元栽培技術開発センター 栽培技術研究グループ長 渡辺研一博士（現東京農工大学教授）、同 元栽培技術開発センター 栽培技術研究グループ主任技術開発員 照屋和久博士（現西海区水産研究所垂熱帯研究センター生産技術グループ長）、同 病害防除部 種苗期疾病研究グループ主任技術開発員 森 広一郎博士（現本部研究推進部 研究開発コーディネーター）、同栽培技術開発センター 栽培技術研究グループ 菅谷琢磨博士（現中央水産研究所 水産遺伝子解析センター 主任研究員）に厚くお礼申し上げます。また、元 広島栽培漁業センターの 服部圭太場長（現本部研究推進部研究開発コーディネーター）ならびに元上浦栽培漁業センター場長 岡 雅一博士（現西海区水産研究所 まぐろ増養殖研究センター 成熟制御グループ長）をはじめとする職員諸氏には、絶大なるご協力を頂き、厚くお礼を申し上げます。

最後になりましたが、種苗生産現場で早朝から深夜まで、時には炎天下での作業、毎回100検体を越える検査業務等の共同作業を行った当時志布志栽培漁業センターの 今泉圭之輔主幹場長、岩本 浩専任技術員、加治俊二主任技術員（現増養殖研究所 養殖技術部 健苗生産研究グループ長）、西 明文当時技術員（現西海区水産研究所奄美庁舎まぐろ増養殖研究センター 種苗量産グループ研究員）、技術員 濱田和久博士（現増養殖研究所養殖システム部養殖実証研究グループ

長）、山元栄一氏、元上浦栽培漁業センターの西岡豊弘主任技術員（現増養殖研究所 魚病診断・研修センター主任研究員）、元古満日栽培漁業センターの 今泉

均技術員（現増養殖研究所養殖技術部ウナギ量産研究グループ主任研究員）および 由利ゆかり氏、榎谷恵子氏、吉岡康美氏、山路郁子氏、上甲美保氏、萩原ひとみ氏、ならびに 東田香織氏の臨時職員の方々にこころよりお礼申し上げます

文 献

- Amend, D.F., 1981. Potency testing of fish vaccines. In: Anderson, D. P., Hennessen, W. (Eds.) *Fish Biologics: Serodiagnostics and Vaccines*. S Karger Basel, pp. 447-454.
- Chakrabarty, A., Ota, S.K., Joseph, B., Kumar, S., Hossain, M.S., Karunasagar, I., Venugopal, M.N., Karunasagar, I., 2002. Prevalence of white spot syndrome virus in wild crustaceans along the coast of India. *Current Science*, **82**, 1392-1397.
- Chang, P.S., Chen, H.C., Wang, Y.C., 1998a. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233-242.
- Chang, P.S., Chen, H.C., Wang, Y.C., 1998b. Development and evaluation of a dot blot analysis for the detection of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in *Penaeus monodon*. *Fish Pathol.*, **33**, 45-52.
- Chen, L.L., Leu, J.H., Huan, C.J., Chou, C.M., Chen, S.M., Wang, C.H., Lo, C.F., Kou, G.H., 2002a. Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology*, **293**, 44-53.
- Chen, Z.L., Wan, C.S., Shin, H.H., 2002b. An assay for quantification of white spot syndrome virus using a capture ELISA. *J Fish Dis.*, **25**, 249-251.
- Cheng, W.T., Liu, C.H., Tsai, C.H., Chen, J.C., 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.*, **18**, 297-310.
- Chou, H.Y., Huang, C.Y., Wang, C.H., Chiang, H.C.,

- Lo, C.F., 1995. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis Aquat Org.*, **23**, 165-173.
- Cominetti, M.R., Marques, M.R.F., Lorenzini, D.M., Lofgren, S.E., Daffre, S., Barracco, M.A., 2002. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Dev Comp Immunol.*, **26**, 715-721.
- Corbel V, Zuprizal SZ, Huang C, Sumartono AJM, Bonami JR, 2001. Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377-382.
- de la Peña, L.D., Tamaki, T., Momoyama, K., Nakai, T., Muroga, K. (1993) : Characteristic of the causative bacterium of vibriosis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **115**, 1-12.
- de la Peña, L.D., Koube, H., Nakai, T., Muroga, K., 1995. Dynamics of *Vibrio* sp. PJ in organs of orally infected kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 39-45.
- Edgerton, B.F., 2004. Susceptibility of the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor* albidus to white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Organ.*, **59**, 187-193.
- 江草周三, 高橋幸則, 伊丹利明, 桃山和夫, 1988. クルマエビのビブリオ病の病理組織学的研究. 魚病研究, **23**, 59-65.
- 江草周三, 若林久嗣, 室賀清邦, 2004. 魚介類の感染症・寄生虫病. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 229-233.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., 2005. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature on the taxonomy of viruses. Eighth report of the international committee on the taxonomy of viruses. Virology division international union of microbiological societies. elsevier academic press, 187-192.
- Flegel, T.W., 1997. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **13**, 433-442.
- Flegel, T.W., 2007. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. *Dev Comp Immunol.*, **31**, 217-231.
- Hameed, A.S., Balasubramanian, G., Musthaq, S.S., Yoganandhan, K., 2003. Experimental infection of twenty species of Indian marine crabs with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis Aquat Organ.*, **57**, 157-161.
- Hossain, M.S., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I., 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. *Aquaculture*, **198**, 1-11.
- Huang, J., Song, X.L., Yu, J., Yang, C.H., 1995. Baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis: study on the pathogen and pathology of the explosive epidemic disease of shrimp. *Mar. Fish. Res.*, **16**, 1-10.
- 藤永元作, 1935. クルマエビの研究 第一報. 早稲水産研究所報告, **1**, 1-51.
- Hudinaga, M., 1942. Reproduction, development and rearing of *Penaeid japonicus*, Bate. *Jap J Zool.*, **1**, 305-393. pls 16-46.
- 畑井喜司雄, 古谷航平, 江草周三, 1978. 養殖クルマエビの鰓黒病起因真菌に関する研究 - I, BG-Fusarium の分離および同定. 魚病研究, **12**, 219-224.
- 畑井喜司雄, 江草周三, 1978. 養殖クルマエビの鰓黒病起因真菌に関する研究 - II . BG-Fusarium に関する2, 3の知見. 魚病研究, **12**, 225-231.
- 本尾 洋, 1988. クルマエビ属 (I . 生態・成熟). エビ・カニ類の種苗生産 (水産学シリーズ No. 71平野礼次郎編) 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9-27.
- 浜崎活幸, 北田修一, 2005. クルマエビの放流効果—現状と課題—, 栽培技研, **33**, 27-43.
- Ishimaru, K., Matsushita, M.A., Muroga, K., 1995. *Vibrio penaeicida* sp. nov., a pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). *Int J Syst Bacteriol.*, **45**, 134-138.
- 井上 潔, 三輪 理, 大迫典久, 中野平二, 木村武志, 桃山和夫, 平岡三登里, 1994. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 電顕観察による原因ウイルスの検出. 魚病研究, **29**, 149-158
- Inouye, K., Yamano, K., Ikeda, N., Kimura, T., Nakano, H., Momoyama, K., Kobayashi, J., Miyajima, S., 1996. The penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), which causes penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **31**, 39-45
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K.,

- Nakagawa, A., Takeo, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., Takahashi, Y., 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, **64**, 277-288.
- Jha, R.K., Xu, X.R., Shen, J., Bai, S.J., Sun, J.Y., Li, W.F., 2006. The efficacy of recombinant vaccines against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii*. *Immunology letters*, **105**, 68-76.
- Jha, R.K., Xu, Z.R., Bai, S.J., Sun, J.Y., Li, W.F., Shen, J., 2007. Protection of *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus using recombinant oral vaccine expressed. *Fish Shellfish Immunol.*, **22**, 295-307.
- Jiravanichpaisal, P., Bangyeekhun, E., Söderhäll, K., Söderhäll, I., 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dis Aquat Organ.*, **47**, 151-7.
- Karunasagar, Indrani., Otta, S.K., Karunasagar, Iddya., 1997. Hostopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. *Aquaculture*, **153**, 9-13.
- Khanobdee, K., Soowannayan, C., Flegel, T.W., Ubol, S., Withyachumnarnkul, B., 2002. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. *Dis Aquat Org.*, **48**, 79-90.
- 木村武志, 山野恵祐, 中野平二, 桃山和夫, 平岡三登里, 井上 潔, 1996. PCR 法による PRDV の検出. 魚病研究, **31**, 93-98.
- 橘高二郎, 隆島忠夫, 金澤昭夫, 1996. エビ・カニ類の増養殖 基礎科学と生産技術. 恒星社厚生閣, 東京, p.1.
- 倉田 博, 1986. クルマエビ幼生の発育段階区分と名称. クルマエビ栽培漁業の手引き (さいばい叢書 No. 1). 日本栽培漁業協会, 東京, pp. 286-287.
- 笠井久会, 渡辺研一, 吉水 守, 2001. 流水式海水電解装置による飼育排水の殺菌, 日水誌., **67**, 222-225.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lan, Y., Lu, W., Xu, X., 2002. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. *Virus Res.*, **90**, 269-274.
- Lee, S.Y., Soderhall, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunol.*, **12**, 421-437.
- Li, Q., Zhang, J., Chen, Y., Yang, F., 2003. White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis Aquat Org.*, **57**, 261-264.
- Lightner, D. V., 1996. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Special Publication of the World Aquaculture Society, Baton Rounge, Louisiana, USA. p. 304.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., 1998. Strategies for the control of viral disease of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165-180.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Ho, C.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996a. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis Aquat Org.*, **25**, 133-141.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Peng, S.E., Chen, C.H., Hsu, H.C., Chiu, Y.L., Chang, C.F., Liu, K.F., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H., 1996b. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org.*, **27**, 215-225.
- Lo, C.F., Ho, C.H., Chen, C.H., Liu, K.F., Chiu, K.Y., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.C., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H., Koh, G.H., 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis Aquat Org.*, **30**, 53-72.
- Luo, T., Yang, H.J., Li, F., Zhang, X.B., Xu, X., 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.*, **30**, 607-617.
- Maeda, M., Itami, T., Furumoto, A., Hennig, O., Imamura, T., Kondo, M., Hirono, I., Aoki, T.,

- Takahashi, Y., 1998. Detection of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) in wild-caught shrimp and other crustaceans. *Fish Pathol.*, **33**, 373-380.
- Miyazaki, T., Yamaguchi, K., Yasumoto, S., Takahashi, Y., 2008. Electron microscopy on the heart of kuruma prawn *Penaeus japonicus* artificially infected with penaeid rod-shaped DNA virus. *Fish Pathol.*, **43**, 97-105.
- 宮島義和, 松本 淳, 1996. 人工養成クルマエビを用いた生検法による採卵用親エビの成熟度判定と効率的な採卵方法. 栽培技研, **25**, 37-40.
- 三宅貞祥, 1982. 原色日本大型甲殻類図鑑 (I). 保育社, 大阪, p.6.
- 桃山和夫, 1981. クルマエビの伝染性中腸腺壊死症に関する研究 - I, 発生状況および症状. 山口県内海水産試験場報告, **8**, 1-11.
- 桃山和夫, 1990. 数種消毒剤のクルマエビの受精卵およびノウブリウスに対する毒性. 山口県内海水産試験場報告, **18**, 50-54.
- 桃山和夫, 平岡三登里, 中野平二, 川辺 博, 井上 潔, 大迫典久, 1994. 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死. 病理組織観察. 魚病研究, **29**, 141-148.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T., Nakano, H., 1995. Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263-269.
- Momoyama, K., Hiraoka, M., Inouye, K., Kimura, T., Nakano, H., Yasui, M., 1997. Mass mortalities in the production of juvenile greasyback shrimp, *Metapenaeus ensis*, caused by penaeid acute viremia (PAV). *Fish Pathol.*, **32**, 51-58.
- Momoyama K, 2003. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) from small penaeid shrimp species caught in the western Seto Inland Sea. *Fish Pathol.*, **38**, 81-85.
- 桃山和夫, 谷村利克, 2004. クルマエビ受精卵のヨード消毒による PAV の予防. 山口県水産研究センター研究報告, **2**, 117-123.
- 桃山和夫, 室賀清邦, 2005. 日本の養殖クルマエビにおける病害問題. 魚病研究, **40**, 1-14.
- 虫明敬一, 有元 操, 佐藤 純, 森広一郎, 1998. 天然クルマエビ成体からの PRDV の検出. 魚病研究, **33**, 503-509.
- Mushiake, K., Shimizu, K., Satoh, J., Mori, K., Arimoto, M., Ohsumi, S., Imaizumi, K., 1999. Control of penaeid acute viremia (PAV) in *Penaeus japonicus*: selection of eggs based on the PCR detection of the causative virus (PRDV) from Receptaculum seminis of spawned broodstock. *Fish Pathol.*, **34**, 203-207.
- 室賀清邦, 2000. 疾病防疫の面から見た放流用種苗生産のあり方 (総説). 栽培技研, **28**, 39-45.
- 中野平二, 河邊 博, 梅沢 敏, 桃山和夫, 平岡三登里, 井上 潔, 大迫典久, 1994. 1993 年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 発生状況および感染実験. 魚病研究, **29**, 135-139.
- 中野平二, 平岡三登里, 鮫島 守, 木村武志, 桃山和夫, 1998. クルマエビ類の急性ウイルス血症 (PAV) の原因ウイルス PRDV の不活化. 魚病研究, **33**, 65-71.
- 永田和宏, 宮坂昌之, 宮坂信之, 山本和彦, 2003. 分子生物学・免疫学 キーワード辞典 第2版. 医学書院, 東京, pp. 44-45.
- Namikoshi, A., Wu, J.L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto M., Muroga, K., 2003. Vaccination trials with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, **229**, 23-25.
- Natividad, C.D.T., Hagio, M., Tanaka, M., Nomura, N., Matsumura, M., 2007. White spot syndrome virus (WSSV) inactivation in *Penaeus japonicus* using purified monoclonal antibody targeting viral envelope protein. *Aquaculture*, **269**, 54-62.
- Nonaka, L., Venegas, C.A., Nishizawa, T., Muroga, K., 1998. A method for nucleic acid extraction from kuruma prawn for PCR detection of PRDV (Penaeid rod-shaped DNA virus). *Fish Pathol.*, **33**, 115-121.
- 日本規格協会編, 2005. JIS ハンドブック 53 環境測定 II 水質. 日本規格協会, 東京, pp. 668-669.
- Peng, B., Ren, J., Shen, J., Zhou, G., Gu, H., Shen, Y., Zheng, G., Gong, Z., 1995. The studies on baculovirus-caused disease of prawns (*Penaeus chinensis*) in Shanghai suburb. *Chinese J Virol.*, **11**, 151-157.
- Phongdara, A., Wanna, W., Chotigeat, W., 2006. Molecular cloning and expression of caspase from white shrimp *Penaeus merguensis*. *Aquaculture*, **252**, 114-120.
- Poulos, B.T., Pantoja, C.R., Bradley-Dunlop, D., Aguilar, J., Lightner, D.V., 2001. Development

- and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org.*, **47**, 13-23.
- Pramod, K.R.B., Rajendran, K.V., Jung, S.J., Oh, M.J., 2002. Experimental susceptibility of different life-stage of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to white spot syndrome virus (WSSV). *J Fish Dis.*, **25**, 201-207.
- Rajendran, K.V., Vijayan, K.K., Santiago, T.C., Krol, R.M., 1999. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crabs and lobsters from India. *J Fish Dis.*, **22**, 183-191.
- Rodriguez, J., Bayot, B., Amano, Y., Panchana, F., de Blas, I., Alday, V., Calderon, J., 2003. White spot syndrome virus infection in cultured *Penaeus vannamei* (Boone) in Ecuador with emphasis on histopathology and ultrastructure. *J. Fish Dis.*, **26**, 439-450.
- Romo-Figueroa, M.G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundoa, R.R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Soderhall, K., Yepiz-Plascencia, G., 2004. Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Dev Comp Immunol.*, **28**, 713-726.
- Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K., 2002. The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virusinfected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J Virol.*, **76**, 7140-7149.
- 水産庁養殖研究所病理部・熊本県水産研究センター, 1996. PCR による PRDV (RV-PJ) の検出法 (平成 8 年度魚病技術者研修魚病専修コース研修用資料) 日本水産資源保護協会, 東京, pp.1-8.
- 水産庁・水産総合研究センター・全国豊かな海づくり推進協会, 2008. 平成18年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績 (全国). p. 8.
- Sakai, T., Hirae, T., Yuasa, K., Kamaishi, T., Matsuyama, T., Miwa, S., Oseko, N., 2007. Mass mortality of cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* caused by *Vibrio nigripulchritudo*. *Fish Pathol.*, **42**, 141-147.
- Sano, T., Nishimura, T., Oguma, K., Momoyama, K., Takeo, N., 1981. Baculovirus infection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.
- 佐藤 純, 虫明敬一, 森広一郎, 有元 操, 今泉圭之輔, 西澤豊彦, 室賀清邦, 1999. クルマエビの種苗生産過程における PAV の発生状況. 魚病研究, **34**, 33-38.
- Satoh, J., Mushiake, K., Mori, K., Arimoto, M., Imaizumi, K., 2001. Control of penaeid acute viremia (PAV) in seed production of *Penaeus japonicus*. *Bull Natl Res Inst Aquacult.*, Suppl **5**, 95-99.
- 佐藤 純, 虫明敬一, 森広一郎, 有元 操, 今泉圭之輔, 2003. 種苗生産過程におけるクルマエビの急性ウイルス血症 (PAV) の防除対策. 栽培技研, **30**, 101-109.
- Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2008. Protection against white spot syndrome virus (WSSV) infection in kuruma shrimps orally vaccinated with WSSV rVP26 and rVP28. *Dis Aquat Org.*, **82**, 89-96.
- Satoh, J., Nishizawa, T., Yoshimizu, M., 2009. Duration and booster effect of phylactic response against white spot syndrome virus infection in kuruma shrimp orally administered with recombinant viral proteins, rVP26 and rVP28. *Fish Pathol.*, **44**, 120-127.
- Shi, Z., Huang, C., Zhang, J., Chen, D., Bonami, J.R., 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *J Fish Diseases.*, **23**, 285-288.
- Soto, M.A., Lotz, J.M., 2001. Epidemiological parameters of white spot syndrome virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. *J Invertebr Pathol.*, **78**, 9-15.
- Sritunyalucksana, K., Sithisarn, P., Withayachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1999. Activation of prophenyloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish Shellfish Immunol.*, **9**, 21-30.
- Sritunyalucksana, K., Lee, S.Y., Soderhall, K., 2002. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol.*, **26**, 237-245.

- Sung, H.H., Kou, G.H., Song, Y.L., 1999. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, **29**, 11-17.
- Supamattaya, K., Hoffmann, R.W., Boonyaratpalin, S., Kanchanaphum, P., 1998. Experimental transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from black tiger shrimp *Penaeus monodon* to the sand crab *Portunus pelagicus*, mud crab *Scylla serrata* and krill *Acetes* sp. *Dis Aqua Org.*, **32**, 79-85.
- 高橋幸則, 山下泰正, 桃山和夫, 1985. 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. 日水誌, **51**, 721-730.
- 高橋幸則, 伊丹利明, 近藤昌和, 1995. 甲殻類の生体防御機構. 魚病研究, **30**, 141-150.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Suzuki, N., Kasornchandra, J., Supamattaya, K., Khongpradit, R., Boonyaratpalin, S., Kondo, M., Kawai, K., Kusuda, R., Hirano, I., Aoki, T., 1996. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of bacilliform virus (RV-PJ) DNA in *Penaeus japonicus* Bate and systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) DNA in *Penaeus monodon* Fabricius. *J Fish Dis.*, **19**, 399-403.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., 1998. Bacterial and viral disease of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) in Japan. *Fish Pathol.*, **33**, 357-364.
- Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G., Yokomizo, Y., 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viremia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). *Fish Shellfish Immunol.*, **10**, 555-558.
- Takahashi, Y., Fukuda, K., Kondo, M., Chongthaleong, A., Nishi, K., Nishimura, M., Ogata, K., Shinya, I., Takise, K., Fujishima, K., Matsumura, M., 2003. Detection and prevention of WSSV infection in cultured shrimp. *Asian Aquaculture Magazine* November/December. pp. 25-27.
- Tapay, L.M., Lu, Y., Gose, R.B., Nadala, J.E.C.B., Brock, J.A., Loh, P.C., 1997. Development of an in vitro quantal assay in primary cell culture for a non-occluded baculo-like virus of penaeid shrimp. *J Virol Methods.*, **64**, 37-41.
- Teunissen, O.S.P., Faber, R., Booms, G.H.R., Latscha, T., Boon, J.H., 1998. Influence of vaccination on vibriosis resistance of giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, **164**, 359-366.
- Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Wang, A.H.J., Zhuang, Y., Walker, P.J., Kou, G.H., Lo, C.F., 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *J Virol.*, **80**, 3021-3029.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Shimizu, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 1999. Pathogenicity of penaeid rod - shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19-23.
- Venegas, C.A., Nonaka, L., Mushiake, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 2000. Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis Aquat Org.*, **42**, 83-89.
- van Hulten, M.C.W., Westenberg, M., Goodall, S.D., Vlak, J.M., 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, **266**, 277-236.
- van Hulten, M.C.W., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J Gen Virol.*, **81** : 2525-2529.
- van Hulten, M.C.W., Witteveldt, J., Snippe, M., Vlak, J.M., 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. *Virology*, **285**, 228-233.
- Vaseeharan, B., Anand, T.P., Murugan, T., Chen, J.C., 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Lett Appl Microb.*, **43**, 137-142.
- Wang, C.S., Tsai, Y.J., Kou, G.H., Chen, S.N., 1997. Detection of white spot disease virus infection in wild-caught greasy back shrimp, *Metapenaeus ensis* (de Haan) in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32**, 35-41.
- Wang, Y.C., Lo, C.F., Chang, P.S., Kou, G.H., 1998. Experimental infection of white spot baculovirus in some cultured and wild decapods in Taiwan. *Aquaculture*, **164**, 221-231.

- Wangteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tssanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.*, **21**, 69-77.
- Witteveldt, J., Vlak, J.M., van Hulten MCW., 2004a. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish Shellfish Immunol* **16**, 571-579.
- Witteveldt, J., Cifuentes, C.C., Vlak, J.M., van Hulten, M.C.W., 2004b. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *Journal of Virology*, **78**, 2057-2061.
- Witteveldt, J., Vlak, J.M., van Hulten, M.C.W., 2006. Increased tolerance of *Litopenaeus vannamei* to white spot syndrome virus (WSSV) infection after oral application of the viral envelope protein VP28. *Dis Aquat Org.*, **70**, 167-170.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org.*, **2**, 69-77.
- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Dis Aquat Org.*, **55**, 3-10.
- Wu, J.L., Namikoshi, A., Nishizawa, T., Mushiake, K., Teruya, K., Muroga, K., 2001. Effects of shrimp density on transmission of penaeid acute viremia in *Penaeus japonicus* by cannibalism and the waterborne route. *Dis Aquat Org.*, **47**, 129-135.
- Wu, J.L., Nishioka, T., Mori, K., Nishizawa, T., Muroga, K., 2002. A time-course study on the resistance of *Penaeus japonicus* induced by artificial infection with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **13**, 391-403.
- Wu, J.L., Muroga, K., 2004. Apoptosis does not play an important role in the resistance of "immune" *Penaeus japonicus* against white spot syndrome virus. *J Fish Dis.*, **27**, 15-21.
- Xie, X., Yang, F., 2005. Interaction of white spot syndrome virus VP26 protein with actin. *Virology*, **336**, 93-99.
- Yan, D.C., Dong, S.L., Huang, J., Yu, X.M., Feng, M.Y., Liu, X.Y., 2004. White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis Aquat Org.*, **59**, 69-73.
- Yan, D.C., Dong, S.L., Huang, J., Zhang, J.S., 2007. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J Invertebr Pathol.*, **94**, 144-148.
- Yang, F., He, J., Lin, X., Li, Q., Pan, D., Zhang, X., Xu, X., 2001. Complete genome sequence the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol.*, **75**, 11811-11820.
- Yang, L.S., Yin, Z.X., Liao, J.X., Huang, X.D., Guoa, C.J., Weng, S.P., Chanc, S.M., Yu, X.Q., Hea, J.G., 2007. A Toll receptor in shrimp. *Molecular Immunol.*, **244**, 1999-2008.
- You, Z., Nadala, E.C.B., Yang, J., van Hulten, M.C.W., Loh, P.C., 2002. Production of polyclonal antiserum specific to the 27.5kDa envelope protein of white spot syndrome virus. *Dis Aquat Org.*, **51**, 77-80.
- Zhan, W.Z., Wang, Y.H., Fryer, J.L., Okubo, K., Fukuda, H., Yu, K., Meng, Q.X., 1999. Production of monoclonal antibodies (Mabs) against white spot syndrome virus (WSSV). *J Aquat Anim Health.*, **11**, 17-22.
- Zhang, J.S., Dong, S.L., Tian, X.L., Dong, Y.W., Liu, X.Y., Yan, D.C., 2006. Studies on the rotifer (*Brachionus urceus Linnaeus*, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, **261**, 1181-1185.

飼育条件下におけるタイマイの繁殖に関する生態, 行動および生理学的研究^{*1}

小林 真人^{*2}

Ecological, Behavioral, and Physiological Evidence of the Hawksbill Turtle Reproduction in Captivity

Masato KOBAYASHI

Abstract : The hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* is a species of sea turtle belonging to the family of Cheloniidae. They inhabit throughout tropical and subtropical coral reef regions of the world. In Japan, this species is seen in areas south from the Izu Peninsula on the Pacific side and Noto Peninsula on the Japan Sea side, while the northern limit of nesting occurs in the Nansei Islands. Hawksbill turtles have been captured not only as a source of protein but also as raw materials for ornaments, because their carapace scutes are richly colored and their aesthetic beauty. Their populations have decreased worldwide in recent year, and the hawksbill turtle has been listed as Critically Endangered. Also, the capture of sea turtles and their eggs is restricted to protect them in many countries around the world, and the international trade of sea turtles is prohibited entirely by CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora).

Research Center for Subtropical Fisheries, Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency has been studying the propagation of the hawksbill turtle for the recovery of the stock by “head-starting” since 1999. The development of the captive breeding technology is essential to recover the stock of this species by head-starting, and therefore it is important to elucidate reproductive biology of hawksbill turtles. In this study, I tried to elucidate the reproductive ecology and physiology of the hawksbill turtle in captivity.

In the first chapter, I investigated plasma testosterone concentrations of 14 male hawksbill turtles held in captivity to determine the sexual maturity of them. I also tried to determine male sexual maturity based on the indices of morphological characteristics, which were the straight carapace length (SCL), tail length (TL) and the ratio of TL to SCL (TE, tail elongation). As a result, plasma testosterone concentrations of mature males gradually increased during the pre-mating season, and then they sharply declined to low levels in the mating season and remained low thereafter. In contrast, the concentrations of immature males remained low throughout the year. Furthermore, I found that sexual maturity of male hawksbill turtles could be estimated by their TE; mature individuals showed the TE of 0.35 or above while immature ones exhibited the indices of 0.33 or less.

In the second chapter, I investigated plasma estradiol-17 β concentrations and follicle in the ovary of 11 female hawksbill turtles held in captivity to elucidate the relationship be-

2011年6月8日受理 (Received, June 8, 2011)

^{*1} 長崎大学審査論文 (掲載に際し投稿規定に沿って一部修正した)

^{*2} 西海区水産研究所亜熱帯研究センター八重山庁舎 〒907-0451 沖縄県石垣市梓海大田148

(Research Center for Subtropical Fisheries, Seikai National Fisheries Research Institute, 148, Fukaiohta, Ishigaki, Okinawa 907-0451, Japan)

tween seasonal change of plasma estradiol-17 β concentrations and the development of follicles. As a result, whenever plasma testosterone concentrations of mature females increased before the mating season, their follicles developed. In contrast, the concentrations of immature females remained low throughout the year, and their follicles did not develop. Reproductive cycle of mature females is two or three years the same as wild hawksbill turtles. However, follicles of one female developed annually in the breeding season, suggesting that female hawksbill turtles have the ability to mature annually.

In the third chapter, I investigated the mating and nesting behavior, clutch size, number of clutches and hatching rate to reveal the reproductive ecology of captive hawksbill caught from the wild. I used a video camera system to determine the date and time of mating and nesting. Mean mating duration ranged from 50 to 150 minutes, and the period from mating to the 1st nesting was 29.6 ± 3.4 days. As for nesting, 4 females nested a total of 16 times between 2006 and 2009. Mean clutch size and number of clutches were 135.9 ± 25.2 eggs and 3.5 ± 0.7 clutches, respectively. These results closely correlated with data from wild populations. Hatching rate of captive eggs was markedly lower compared to wild eggs. However, the straight carapace length and body weight of hatchlings in captivity were comparable to the wild ones.

Finally, I was able to clarify the reproductive ecology and physiology of the hawksbill turtle in captivity. The achievement of this study makes a huge step forward for the ability to produce significant number of juveniles for stock enhancement and aquaculture of the hawksbill turtle. To further stock enhancement and aquaculture of them, there is an urgent need to promote studies on improving the level of the hatching rate of the hawksbill turtle in captivity.

キーワード：絶滅危惧種，増養殖，タイマイ，繁殖生理，繁殖生態

目 次

緒 言

第1章 雄の血漿テストステロン濃度の季節変動と二次性徴

第2章 雌の血漿エストラジオール-17 β 濃度の季節変動と卵胞の発達

第3章 飼育条件下におけるタイマイの繁殖生態

第4章 総合考察

謝 辞

文 献

緒 言

本研究の対象種であるタイマイ *Eretmochelys imbricata* は、ウミガメ科に属するウミガメ類の1種である。ウミガメは海洋環境に適応した爬虫類であり、現代のウミガメ類の祖先はおおよそ1億1千万年前の白亜紀に出現した (Spotila, 2004)。白亜紀には4科のウミガメ類が存在したが、その後2科

のウミガメ類は絶滅し、現在はウミガメ科6種 (アオウミガメ *Chelonia mydas*, アカウミガメ *Caretta caretta*, ケンブヒメウミガメ *Lepidochelys kempii*, タイマイ, ヒメウミガメ *L. olivacea*, ヒラタウミガメ *Natator depressus*) とオサガメ科1種 (オサガメ *Dermochelys coriacea*) の7種のウミガメが生存している (Spotila, 2004)。ウミガメ科6種は、いずれも背部と腹部に硬い甲羅を有し、前鰭と後鰭は角質化した鱗で覆われている。その大きさは、種によって異なるものの、甲長55~124 cm, 体重36~204 kgである。一方、オサガメ科のオサガメは硬い甲羅を持たず、背甲は薄い弾力性のある皮膚で覆われ、その大きさは甲長132~178 cm, 体重250~907 kgと現存するウミガメ類の中では最も大きい種である (Spotila, 2004)。ウミガメ類の生息海域は熱帯から温帯の海域であるが、ケンブヒメウミガメの成体はメキシコ湾に、ヒラタウミガメはオーストラリア北部の沿岸に特異的に分布する。また、オサガメは熱帯から亜寒帯域まで回遊することが知られている (Spotila, 2004)。ウミガメ類の産卵は砂浜で行われ、卵は砂中の産卵巣内に産

み落とされる。産卵からおよそ60日後に仔ガメはふ化し、産卵巣から這い出て、砂浜を下り、外洋に泳ぎ出す。その後しばらくは仔ガメの生息場所や生態などがよくわかっていないことから、この期間を「The lost years」と称している。成熟した個体は索餌海域から交尾海域に移動して交尾する。交尾期が終了した雄は再び索餌海域に戻るが、雌はその海域に留まり、およそ2週間間隔で複数回の産卵を繰り返した後、索餌海域に移動する。ウミガメ類は、古くからタンパク源の一つとして肉や卵が食用として、また剥製や甲羅を用いた工芸品の原料としても世界各地で利用されてきた。しかし、乱獲、漁業での混獲、産卵場である砂浜の荒廃などの様々な人間活動の脅威にさらされ、ウミガメ類の個体数は減少している (Lutcavage *et al.*, 1997)。ヒラタウミガメを除くウミガメ類は、国際自然保護連合 (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 以下、IUCN と略す) の絶滅のおそれのあるレッドリスト (The IUCN Red List of Threatened Species, 以下、レッドリストと略す) に記載されている。ウミガメ類の資源を保護するため、多くの国でウミガメやその卵を捕獲することは厳しく制限されている。また、エビトロール網におけるウミガメ脱出装置の装着、マグロ延縄漁業における釣餌や釣針を改良することによるウミガメ類の混獲率を低減させる研究 (Lutcavage *et al.*, 1997; 阿部, 南, 2008) などが行われている。さらに、絶滅のおそれのある野生動植物の種の国際取引に関する条約 (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 以下、CITES と略す) において、ウミガメ全種は付属書 I (Appendix I) に記載され、国際的な商業目的の取引が全面的に禁止されている (Pritchard, 1997)。一方、より積極的にウミガメ類の資源を回復させる方策として、ふ化した仔ガメをある程度の期間 (数日から数年) 飼育条件下で育成した後に天然海域に放流する、いわゆる Head-Starting (以下、ヘッドスターティングと記す) が、アオウミガメ、ケンプヒメウミガメ、タイマイなどで試みられてきた (Bell and Parsons, 2002, Sato and Madriasau, 2001; Fontaine and Shaver, 2005; 與世田, 清水, 2006)。その効果はタイマイではまだ検証されていないが、アオウミガメやケンプヒメウミガメでは放流した個体が成熟して産卵した事例が報告されはじめており、ヘッドスターティングの効果の一端が徐々に明らかになっている (Bell and Parsons, 2002; Fontaine and Shaver, 2005)。

日本近海には主にアオウミガメ、アカウミガメ、タイマイの3種が分布し、オサガメ、ヒメウミガメの分

布も確認されている (Uchida and Nishiwaki, 1982)。このうちアオウミガメ、アカウミガメおよびタイマイの3種は日本沿岸で産卵する (Uchida and Nishiwaki, 1982; Kamezaki, 1989)。日本における3種の主要な産卵地は、アオウミガメは沖縄県、鹿児島県 (屋久島、奄美大島) および小笠原諸島、アカウミガメは沖縄県から福島県までの太平洋沿岸、タイマイは沖縄県である (社団法人日本水産資源保護協会, 1998)。日本でもウミガメが産卵する地域においては、古くからその肉や卵は重要なタンパク源として利用され、また工芸品の原料としても供されてきた (紀伊半島ウミガメ情報交換会, 1994)。しかし、ウミガメ類は漁業の対象生物として考えられていなかったため、正確な漁獲統計は少なく、正確な漁獲量や資源量の推定は行われていない。しかし、現在日本におけるウミガメ類はいずれも希少種と位置づけられ (社団法人日本水産資源保護協会, 1998)、ウミガメやその卵の捕獲は水産資源保護法に基づく漁業調整規則等で制限されている。しかし、世界各国のウミガメ類の保護対策の中で、日本は世界で最も保護対策の進んでいない国とされている (Spotila, 2004)。また、日本国内におけるヘッドスターティングによるウミガメ類の資源回復に関する試験研究は、ほとんど行われていないのが現状である (與世田, 清水, 2006)。

日本で産卵するウミガメ3種のうち、タイマイはIUCNのレッドリストでアオウミガメやアカウミガメよりも高いランクに記載されている。日本における本種の産卵地は南西諸島に限定され、年間の産卵頭数も非常に少ない (Kamezaki, 1989; 社団法人日本水産資源保護協会, 1998)。著者が所属する石垣島ウミガメ研究会が、毎年行っている石垣島の産卵調査では、本種の年間の産卵個体は数頭程度であり、産卵個体が確認されない年もある。本種の甲羅は特にその模様が美しく、また他種よりも厚みがあるため、工芸品の原料として世界各地で利用されてきた。しかし、そのことが本種の乱獲を招いたと指摘されている (Pritchard, 1997)。また、日本がべっ甲細工の原料として海外から大量に本種の甲羅を輸入したことも問題視されている (Canin, 1991; Steiner, 2001)。一方、CITESによって本種の輸入が禁止されたことにより、日本のべっ甲産業は原料の調達が不可能となり、存亡の危機に直面している。そのため、国内におけるタイマイ養殖や野生タイマイを捕獲することによる原料の確保が期待されている。

このようなことを背景として、1999年から独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所石垣支所 (当時は社団法人日本栽培漁業協会。以下、当研

究所と略す)はヘッドスターティングによる本種資源の回復を目指し、増殖技術の開発を開始した(與世田, 清水, 2006)。ヘッドスターティングを行うためには、安定的な仔ガメの確保が不可欠であり、そのためには安定的に卵を得る採卵技術の開発が必要である。採卵方法は、野生個体が産卵した卵を採捕する天然採卵と飼育条件下で養成した個体に産卵させる人工採卵がある。上述したように日本における本種の産卵個体数は非常に少ないことから、天然採卵を行うことは困難であった。そこで、当研究所では石垣島周辺海域に比較的多く生息する未成熟なタイマイの雌雄を捕獲し、これらを陸上水槽で養成し、成熟した雌雄を繁殖に供して採卵することとした。人工採卵によって安定的に卵を得るためには、本種の繁殖生態や繁殖生理に基づいた人工繁殖の技術開発が不可欠である。ウミガメ類の性成熟年齢や生物学的最小型に関する情報は乏しく、本種では雌の性成熟サイズは直甲長68~80cmであると報告されているが、雄については年齢も性成熟サイズもわかっていない(Márquez, 1990)。ウミガメ類の成熟に伴う二次性徴について、雌では外部形態の変化は見られないが、雄では尻尾の伸長、前鰭の爪の発達、腹甲胸部の軟化などの形態変化が見られ(Limpus, 1992; Owens, 1997; Spotila, 2004)。本種では雄の尻尾の長さによって成熟個体を識別できることが報告されている(Limpus, 1992; van Dam and Diez, 1998)。ウミガメ類の繁殖生態について、交尾行動は野外(Frazier, 1971; Booth and Peters, 1972; Limpus and Reed, 1985)や飼育条件下(Simon *et al.*, 1975; Ulrich and Parkes, 1978; Wood and Wood, 1980)の観察事例が報告されており、Booth and Peters (1972)は、野生アオウミガメの交尾行動の詳細な観察結果を報告している。本種の交尾行動に関してはデータが乏しく(Márquez, 1990)、Kobayashi *et al.* (2006)が飼育条件下における交尾と産卵行動の観察結果について報告しているだけである。本種を初めとした多くのウミガメ類の産卵とふ化は、世界各地の産卵地で野外調査が実施されている(Márquez, 1990)。しかし、日本の野生タイマイは産卵個体数が少ないため(Kamezaki, 1989)、産卵生態に関するデータは極めて少ない。また、飼育条件下におけるウミガメ類の産卵やふ化に関しては、アオウミガメ(Simon *et al.*, 1975; Ulrich and Parkes, 1978; Wood and Wood, 1980)やケンブヒメウミガメ(Rostal, 2005)の研究結果が報告されているが、本種に関しては、いくつかの研究機関で研究されているものの、公表されている報告は当研究所の事例以外にない(Shimizu *et al.*, 2005, Kobayashi *et al.*, 2006)。

上述した成熟や繁殖行動はホルモンによって誘発されることから、成熟や繁殖行動を生理学的な側面から明らかにするため、体内におけるホルモンの動態を調査することが必要である。ウミガメ類の繁殖に関連するホルモンについて、雄の二次性徴の発現、精巣の発達および交尾行動にはテストステロンが深く関与しており、雌における卵胞の発達、交尾海域への回遊、交尾行動、排卵、産卵などの一連の繁殖生態には、エストラジオール、テストステロン、黄体形成ホルモンおよびプロゲステロンが関与している(Owens and Morris, 1985)。これらのホルモンの季節変動や繁殖生態との関連について、野生個体を対象とした調査は、アオウミガメ(Jessop *et al.*, 2004)、アカウミガメ(Wibbels *et al.*, 1987; Wibbels *et al.*, 1990; Whittier *et al.*, 1997)、オサガメ(Rostal *et al.*, 1996; Rostal *et al.*, 2001)、ケンブヒメウミガメ(Rostal, 2005)およびヒメウミガメ(Licht *et al.*, 1982)で実施されている。また、飼育個体を対象とした調査は、アオウミガメ(Wood *et al.*, 1979, Licht *et al.*, 1985)とケンブヒメウミガメ(Rostal, 2005)で実施されている。タイマイでは、野生個体の雄の血中テストステロン(Jessop *et al.*, 2004)や雌の血中エストラジオール-17 β (Dobbs *et al.*, 2007)に関する報告が2事例あるのみで、飼育個体に関しては公表されている報告はない。このように、本種の繁殖生態や繁殖生理に関する情報は、野生個体の産卵生態に関するものは多くあるものの、成熟や繁殖行動に関する生態学的、行動学的な知見だけでなく、それらの裏付けとなるホルモンの動態に関する生理学的な知見もほとんどないのが現状である。したがって、本種の人工繁殖に関する技術を開発するためには、飼育条件下における本種の生態学的、行動学的、生理学的な調査を行うとともに、それらの結果を野生個体の事例と比較検証する必要がある。

人工採卵を行うためには、はじめに養成個体の中から成熟個体を選別し、それらの個体を用いて安定的に交尾させることが重要である。そのためには、成熟や繁殖行動に関連した性ホルモンの動態を明らかにすることが必要である。そこで、雄については血中のテストステロン濃度の季節変動を調査し、成熟や交尾行動との関係を明らかにするとともに、二次性徴である尻尾の長さをもとに成熟個体が判別できるか否かを検証した(第1章)。雌については血中のエストラジオール-17 β 濃度の季節変動と卵巣の発達を調査し、それらの関係を明らかにした(第2章)。次に、交尾に成功した雌が人工的に造られた砂浜で正常に産卵を行うか、また得られた卵のふ化率や仔ガメが野生個体と差

異がないかなどを検証する必要がある。そこで、産卵行動を観察して産卵数、産卵間隔、産卵回数を調査するとともに、得られた卵をふ化させてふ化仔ガメの大きさやふ化率を調べ、これらの結果を野生タイマイの既存の報告事例と比較検証し、飼育条件下における産卵とふ化の特徴を明らかにした（第3章）。最後に、本研究で得られた結果から本種の繁殖機構を明らかにし、その知見をもとに人工繁殖の基礎的な技術を提言するとともに、残された課題を整理し、今後取り組むべき研究について言及した（第4章）。

第1章 雄の血漿テストステロン濃度の季節変動と二次性徴

人工採卵を行うためには、養成個体の中から成熟個体を選別し、それらの個体を安定的に交尾させることが重要である。そのためには、雄の性ホルモンの動態を調べ、成熟や交尾行動との関係を明らかにする必要がある。爬虫類、鳥類およびほ乳類の雄において、テストステロンは生殖腺における性ステロイド合成の最終生産物であり（Kime, 1987）、カメ類においても主要な生産物として合成される（Boume and Licht, 1985）。また、テストステロンがウミガメ類の雄の繁殖に重要な役割を果たすことがいくつか報告されている。例えば、野生のアカウミガメ（Wibbels *et al.*, 1987; Wibbels *et al.*, 1990）、飼育条件下のアオウミガメ（Licht *et al.*, 1985）やケンブリメウミガメ（Rostal, 1985）では、血中テストステロン濃度の上昇が精子形成と深く関連することが明らかにされている。また、Owens and Morris (1985) は未成熟なウミガメにテストステロンを投与するとペニスと尻尾が伸長することを実証している。これらの結果は、雄のウミガメ類において、テストステロンが二次性徴や性行動と深く関連しており、雄の成熟の指標として利用できることを示唆している。また、Limpus (1992) や van Dam and Diez (1998) は、本種の雄の二次性徴の一つである尻尾の長さが成熟個体を選別するための指標として有効であることを報告している。そこで、本章では飼育条件下で養成しているタイマイ雄14頭の血中のテストステロン濃度の季節変動を調査し、成熟や交尾行動との関係を明らかにした。また、既報の尻尾の長さを指標とした成熟度の判別方法（Limpus, 1992; van Dam and Diez, 1998）の有効性を検証するとともに、新たな判定指標の開発を試みた。

材料と方法

供試個体 沖縄海区漁業調整委員会の許可を受けて、1999年から2002年にかけて石垣島周辺海域に生息するタイマイ25頭を捕獲し、これらを当研究所で養成した個体を本研究に使用した。捕獲したタイマイの性別は外部形態からは判別できなかったことから、内視鏡検査によって直接生殖腺を観察して雌雄を判別したところ、雄14頭、雌11頭であった。供試個体は、内部標識（ID-100A, サージミヤワキ）と外部標識（Jumbo Tag, 特定非営利活動法人日本ウミガメ協議会）によって個体識別した。捕獲時のタイマイの直甲長の平均値（平均値 ± 標準偏差）は、雌では56.0 ± 10.4 cm、雄では53.0 ± 11.1 cmであった。捕獲時の雄の直甲長は、1頭が82.0 cmであり（Fig. 1-1）、残り13頭は62.5 cm以下であった。雄の性成熟と直甲長の関係に関する報告は少ないが、van Dam and Diez (1998) はカリブ海に生息するタイマイの調査結果から、雄の成体の最小直甲長は68.2 cmと報告している。生息地域は異なっているが、この結果をもとに本研究に用いた捕獲時の雄の性成熟の状態を区分すると、1頭は性成熟していた可能性が高く、その他の個体は未熟であったと推測された。

交尾方法 本研究は、2007年から2008年にかけて実施した。雄の成熟状態を調査するため、雄14頭と成熟した雌を用いて3月から6月にかけて交尾試験を行い、交尾行動を観察するとともに、交尾の成否を調べた。本研究において、交尾とは雄が雌の背中に乗って前後の鰭で雌を掴み、尻尾を曲げてペニスを挿入しようとする行動、交尾行動とは交尾するために雄が雌を追尾して背中に乗ろうとする行動と定義した。また、交尾しても、雄が雌の体内で射精して受精卵が得られなければ交尾に成功したとはいえない。そこで、雌が雄と交尾した後に産卵した場合、そのときの交尾で精子の受け渡しが行われ、交尾に成功したと判断した。交尾試験は、屋外にある110 kL コンクリート製水槽（Fig. 1-2, 12 × 8 × 1.2 m、以下は110 kL 水槽と略す）4基で行った。雌雄の組み合わせは、はじめは雌1頭に対して雄1～7頭の比率とし、雄の交尾行動を確認した。雌が複数の雄と交尾すると、交尾に成功した雄を特定できないことから、複数の雄が雌に対して交尾行動を示した場合は、雌雄をそれぞれ1頭ずつに組み直し、再び交尾試験を行った。また、交尾が確認された雌は、その年のその後の交尾試験には使用しなかった。交尾試験は日中のみ行い、夜間は雌雄を別々の水槽に移した。交尾行動は、目視とビデオカメラシステム（カメラ：IR-6000, ダイワインダストリ, レ



Fig. 1-1. Hawksbill turtle (male, straight carapace length 83 cm)



Fig. 1-2. Photograph of a 110 kL rearing tank

コーダー：AV-S7004W、システム エイ・ブイ）を用いて観察した。本研究では、後述するように、2007年と2008年に14頭中5頭で交尾行動が観察され、9頭は両年ともに交尾行動を示さなかった。そこで、後述する血漿テストステロン濃度の季節変動と交尾行動との関係を調べるため、本研究では交尾行動を示した5頭

（M-1～M-5）をグループ A、それ以外の個体（M-6～M-14）をグループ Bとして区分した。

飼育方法 供試個体は、與世田、清水（2006）の方法に準じて飼育した。供試個体は110 kL水槽数基に分けて収容し、養成した。飼育水は砂ろ過海水を使用し、換水量は2～10 kL/時、水温は自然条件とし

た。光周期は自然条件とし、石垣島の日の出と日の入り時間から算出した試験期間中の明期は10.6~13.6時間であった。餌料は、カタクチイワシ *Engraulis japonicus* とマツイカ *Illex argentinus* を用いた。タイマイは水温24℃以下では摂餌量が減少することから、給餌量は水温24℃以上では供試個体の体重の2%、水温24℃未満では1%とした。また、ビタミン類やカルシウムを補うため、総合ビタミン剤（ヘルシーミックス-2, 大日本製薬）とカルシウム剤（ナグラシ0号, コーラルインターナショナル）をそれぞれ給餌量の2.5%を展着させた。給餌は、摂餌状況により1週間あたり3~5日とした。

採血とホルモン測定 供試個体の血漿テストステロン濃度を把握するため、毎月1回採血し、その方法は以下のとおりとした。供試個体の頸部の血管から注射器（注射針；18G × 70 R.B GA, ニプロ, 注射筒；SS-10SZ, テルモ）で10 mlを採血し、ヘパリン処理した採血管（VP-H100K, テルモ）に入れ、遠心分離するまでアイスボックス内で冷蔵保存した。採血後1~2時間以内に血液を遠心分離（10分, 2,500 rpm）し、得られた血漿はホルモンを測定するまで-80℃で凍結保存した。テストステロンの測定はBML（ビー・エム・エル）に依頼し、アーキテクト・テストステロンキット（ARCHITECT Testosterone; アボットジャパン）を用いたCLIA法（Chemiluminescent immunoassay）により測定した。テストステロンの測定可能範囲は0.14~15 ng/ml, 交差反応率は5 α -ジヒドロテストステロンが2.1%, 5 α -アンドロスタン-3 β , 17 β -ジオールが0.2%, 11 β -ジヒドロキシテストステロンが14.1%, アンドロステンジオンが0.1%であった。

直甲長と尻尾の全長の測定 供試個体の直甲長と尻尾の全長（以下、尻尾長と略す）は、毎月1回、ノギス（MA1270BLUE; Haglöf Inc.）を用いて0.1 cm単位まで測定した。直甲長は、背甲の最前部の甲羅の凹部から最後部の甲羅の先端までの直線距離、尻尾長は腹甲の最後部から尻尾の最先端までの直線距離とした（Fig. 1-3）。雄の性成熟を判定する新たな指標として、本研究では尻尾長を直甲長で除した比率（Tail Elongation; 以下、TEと略す）を用いた。

統計処理 グループ間の血漿テストステロン濃度、直甲長、尻尾長およびTEの違いを調べるため、多重解析検定（Tukey-Kramer法）を用い、有意水準5%で検定した。また、2007年と2008年の血漿テストステロンの季節変動の相似性を調べるため、ピアソン相関係数検定を用い、有意水準5%で検定した。検定は表計算ソフト（エクセル2002, マイクロソフト）のアド

インソフト STATCEL2（4 steps エクセル統計, オーエムエス出版）を用いて行った。

結 果

血漿テストステロン濃度の季節変動 2007年と2008年の血漿テストステロン濃度の変化を Fig. 1-4に示す。交尾行動が確認されたグループAの5頭の血漿テストステロン濃度は、両年ともに大きな変動が観察され、その変動パターンは両年で同じ傾向を示した（Pearson's correlation coefficient test, $r = 0.79$, $p < 0.05$ ）。グループAの平均血漿テストステロン濃度は、2007年1月から上昇し（平均濃度 $\pm$ 標準偏差, 30.7

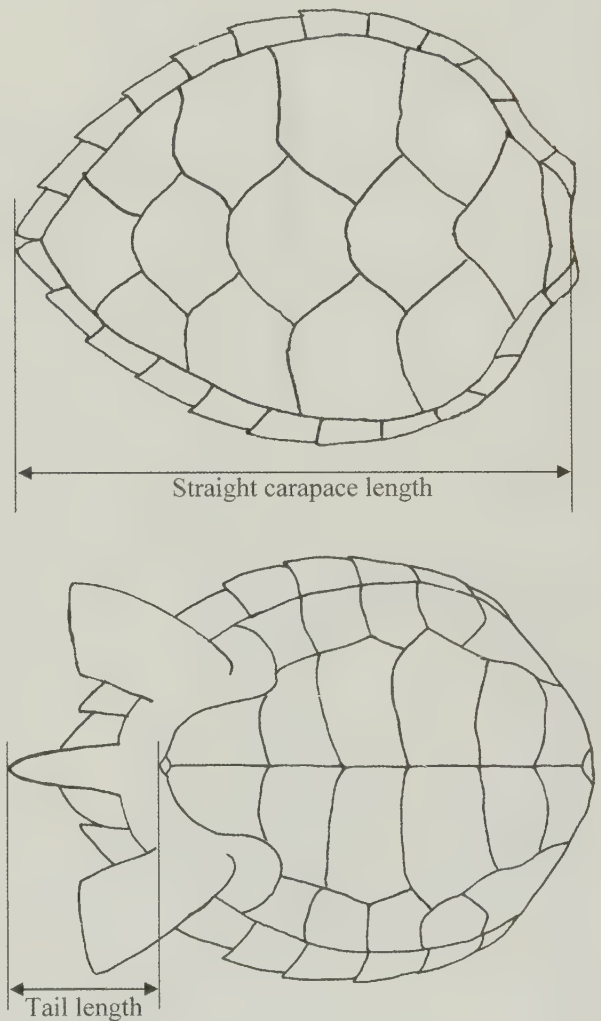


Fig. 1-3. Diagrams of measurement points in straight carapace length (SCL, upper) and tail length (TL, lower) of the hawksbill turtle used in the present study. SCL was from the distance from the nuchal scute notch to posteriormost scute tip and TL was from the posteriormost plastron to the tail tip.

± 12.1 ng/ml), 4月に最高値(平均濃度 $\pm$ 標準偏差, 44.6 ± 9.0 ng/ml)に達した。その後, その濃度は急速に低下し, 8月には最低値(平均濃度 $\pm$ 標準偏差, 6.8 ± 2.2 ng/ml)を示した。2007年11月から再び濃度の上昇がみられ, 2008年5月に最高値(平均濃度 $\pm$ 標準偏差, 37.4 ± 14.0 ng/ml)に達し, その後は2007年と同様の変動パターンを示した。一方, グループBの平均血漿テストステロン濃度は, 両年ともに低レベル(平均濃度 $\pm$ 標準偏差, 1.2 ± 0.6 ng/ml $\sim 4.8 \pm 2.3$ ng/ml)で推移し, その変動パターンも両年ともに同じ傾向を示した(Pearson's correlation coefficient test, $r = 0.78$, $p < 0.05$)。

交尾行動 交尾行動は14頭中5頭(M-1～M-5)で観察された(Table 1-1)。5頭のうち, 2007年に2頭(M-1, M-2), 2008年に2頭(M-2, M-3)がそれぞれ交尾に成功し, その時期はいずれも5月であった。一方, M-4とM-5は交尾を試みたものの, すぐに雌から離れる行動を示し, 交尾は成功しなかった。

直甲長と尻尾長の発達およびTE 直甲長, 尻尾長およびTEについて, 捕獲時と2007年および2008年の年間の平均値をTable. 1-2に示す。また, 各個体の2007年と2008年の年間の平均値をFig. 1-5に示す。グループAとグループBの平均直甲長は, 2007年と2008年ともにグループ間で有意な差は認められ

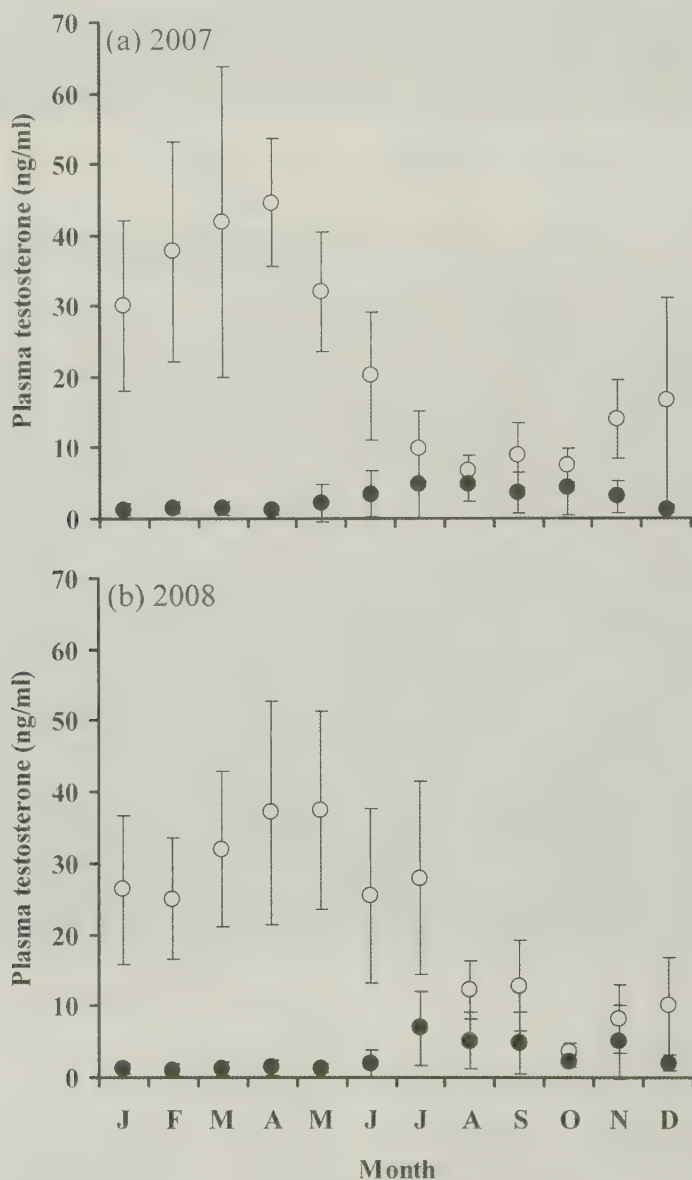


Fig. 1-4. Seasonal changes of plasma testosterone of Group-A (○) and Group-B (●) in 14 hawksbill turtles between 2007 and 2008. Data was mean $\pm$ SD.

Table 1-1. Results of observation of mating behavior and mating success in both groups in 2007 and 2008

Year	No. turtles displayed mating behavior		No. turtles succeeded in mating	
	2007	2008	2007	2008
Group-A	5	5	2	2
M-1	+	+	+	×
M-2	+	+	+	+
M-3	+	+	×	+
M-4	+	+	×	×
M-5	+	+	×	×
Group-B	0	0	0	0
M-6	×	×	×	×
M-7	×	×	×	×
M-8	×	×	×	×
M-9	×	×	×	×
M-10	×	×	×	×
M-11	×	×	×	×
M-12	×	×	×	×
M-13	×	×	×	×
M-14	×	×	×	×

Description of M-1 to M-14 indicates each experimental turtle. Plus and cross marks in the column of “No. turtles displayed mating behavior” indicate that the former displayed mating behavior and the latter did not displayed it. The same symbols appeared in the column of “No. turtles succeeded in mating” indicate that the former is success to functional mating and the latter is not success to functional mating with female. In this study, functional mating means obtaining fertilized eggs after mating.

Table 1-2. The means of straight carapace length of the male hawksbill turtles when they were captured and annual means of straight carapace length, tail length and TE in the male hawksbill turtles in 2007 and 2008

	At capture		2007		2008	
	Group-A	Group-B	Group-A	Group-B	Group-A	Group-B
Straight carapace length (cm)	64.2 ± 10.2	46.7 ± 5.3	75.1 ± 3.9 ^{ab}	69.0 ± 4.3 ^{ab}	75.3 ± 3.6 ^{cd}	69.5 ± 4.4 ^{cd}
Tail length (cm)	Unkown	Unkown	28.8 ± 3.6 ^a	18.8 ± 3.2 ^b	28.9 ± 3.4 ^c	19.7 ± 3.1 ^d
TE*	-	-	0.38 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.03 ^c	0.28 ± 0.04 ^d

Data are mean ± SD. *, TE indicates the ratio of tail length to straight carapace length. Different letters represent significant difference among two groups in 2007 and 2008 (Tukey-Kramer multiple comparison test, $p < 0.05$, $a > b$, $c > d$).

ず (Table. 1-2, $p > 0.05$), 各個体の平均直甲長はグループ間で重複がみられた (Fig. 1-5)。平均尻尾長は, グループ B よりもグループ A の方が両年ともに有意に長かったが (Table 1-2, Tukey-Kramer multiple-comparison test, $p < 0.05$), グループ A の最小値とグループ B の最大値は非常に近接して

いた (Fig. 1-5) 一方, 平均 TE はグループ B よりもグループ A の方が有意に高く (Table. 1-2, Tukey-Kramer multiple-comparison test, $p < 0.05$), グループ A の最小値とグループ B の最大値も明確に区分され, 2008年における前者の値は0.35, 後者の値は0.33であった (Fig. 1-5)。

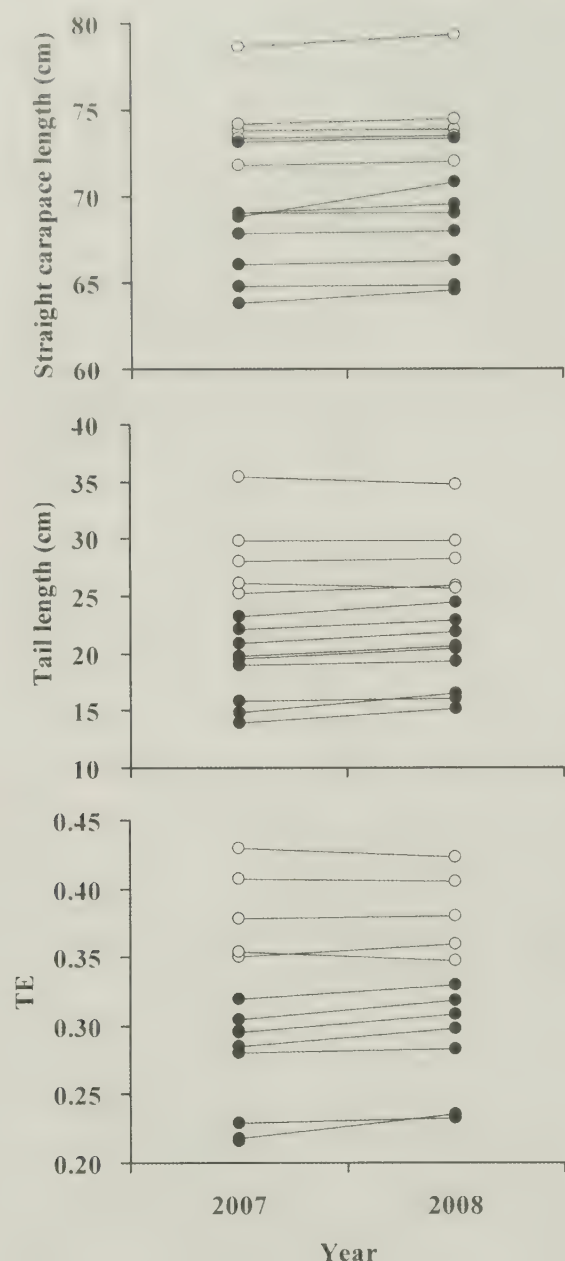


Fig. 1-5. Annual changes of straight carapace length (SCL, upper), tail length (TL, middle) and TE (ratio of TL to SCL, lower) of each individual of 14 hawksbill turtles in Group-A (○) and Group-B (●) in 2007 and 2008.

血漿テストステロン濃度と尻尾長および TE との関係 2007年と2008年のグループ A の血漿テストステロン濃度と尻尾長はグループ B よりも有意に高かったが (Fig. 1-6, Tukey-Kramer multiple-comparison test, $p < 0.05$), グループ A とグループ B の尻尾長の標準偏差は一部で重複がみられた。一方, 2007年と2008年のグループ A の血漿テストステロン濃度と TE はグループ B よりも有意に高く (Fig. 1-7,

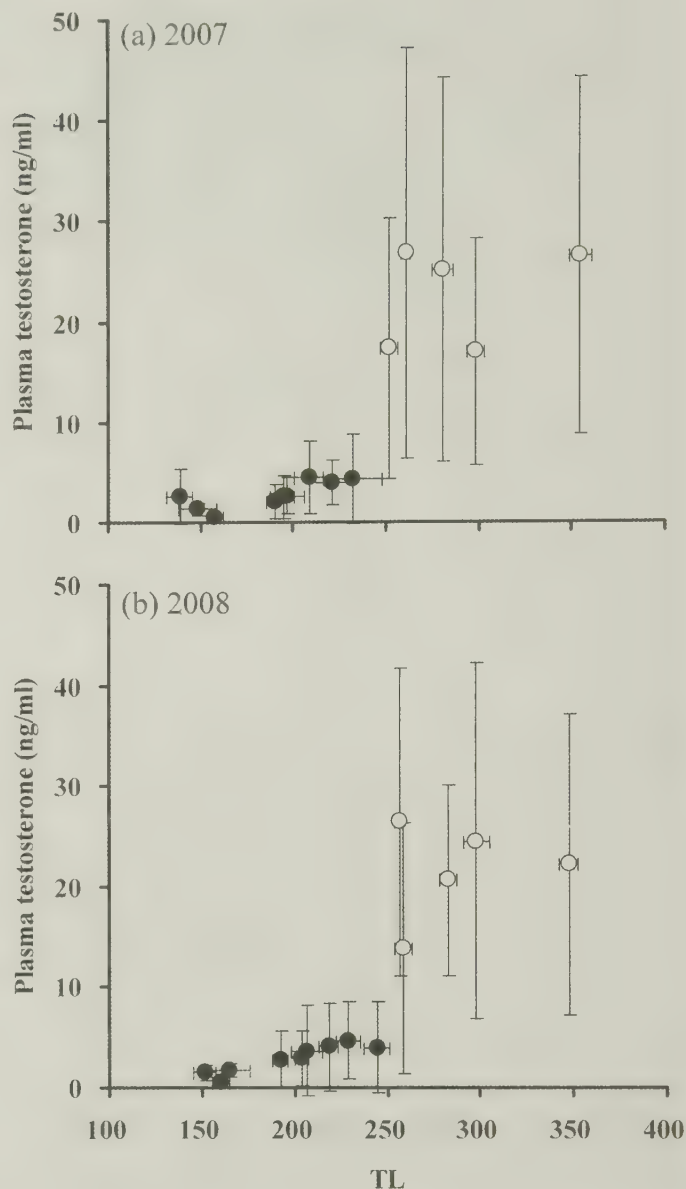


Fig. 1-6. Relationship between the plasma testosterone level and tail length (TL) of Group-A (○) and Group-B (●) in 14 hawksbill turtles between 2007 and 2008. Data was mean $\pm$ SD.

Tukey-Kramer multiple-comparison test, $p < 0.05$), また両グループの TE の標準偏差は重複することなく, 明確に区分された。

考 察

本研究では, 2007年の交尾行動の観察結果をもとに, 雄14頭のうち, 交尾行動が観察された5頭をグループ

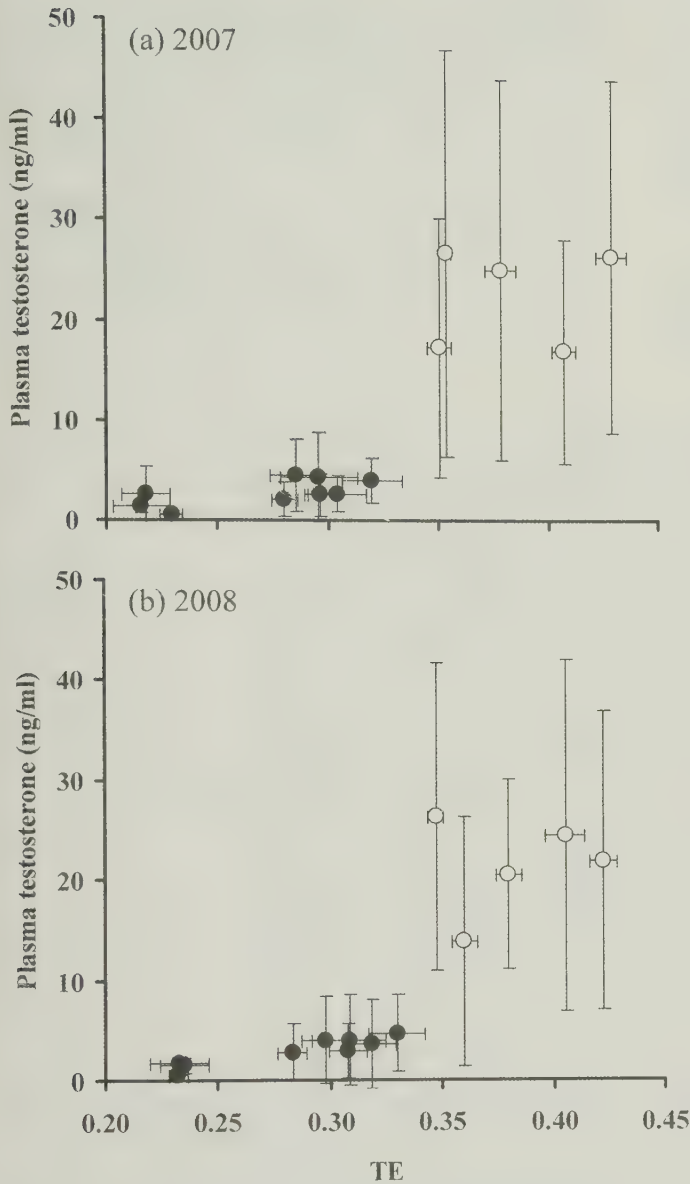


Fig. 1-7. Relationship between the plasma testosterone level and TE (ratio of TL to SCL) of Group-A (○) and Group-B (●) in 14 hawksbill turtles between 2007 and 2008. Data was mean $\pm$ SD.

A. 観察されなかった9頭をグループBに区分した。しかし、その時点における各個体の性成熟の状態は不明であった。そこで、性成熟しているか否かを明らかにするため、全個体の血漿テストステロン濃度を測定した。その結果、グループAの血漿テストステロン濃度は2007年と2008年ともに4月から5月にかけて最高値に達し、その後減少するという季節変動を示した。また、グループAの5頭はいずれも交尾行動が観察され、交尾に成功した時期はいずれも5月であった。一方、グループBの9頭の血漿テストステロン

濃度は、両年ともに低濃度で推移し、グループAのような大きな季節変動はみられなかった。また、両年ともに全個体で交尾行動は観察されなかった。これは、テストステロンが本種の成熟や交尾行動と関係していることを示唆する。

ウミガメ類の雄のテストステロン濃度の季節変動について、野生のアカウミガメ (Wibbels *et al.*, 1987; Wibbels *et al.*, 1990) やアオウミガメ (Jessop *et al.*, 2004) において、交尾期前に上昇し、交尾期前から交尾期にかけて最高値に達し、その後減少するという変動パターンが報告されている。飼育条件下におけるケンブヒメウミガメ (Rostal, 2005) やアオウミガメ (Licht *et al.*, 1985) においても、野生個体と同様に交尾活動が始まる前にテストステロン濃度が上昇することが知られている。一方、未成熟個体のテストステロン濃度に関して、Jessop *et al.* (2004) は、野生の未成熟なアオウミガメやタイマイのテストステロン濃度は成熟個体と比較して低いこと、また交尾行動を示さない雄のアオウミガメの成体の血漿テストステロン濃度は周年低濃度であることを報告している。これらの結果は、成熟した雄のウミガメのテストステロン濃度は、交尾期前に増大してその後減少するという変動を示し、未成熟なウミガメ類のテストステロン濃度は、周年低濃度であることを示している。Owens and Morris (1985) はテストステロンの役割を調べるため、テストステロンを未成熟なウミガメに注射することによって、交尾行動が誘発されることを実証している。また、ケンブヒメウミガメの精巣は、交尾前の急速なテストステロン濃度の上昇とともに発達することが飼育条件下で観察されている (Rostal, 2005)。これらのことから、テストステロン

が雄の成熟や交尾行動を誘発するために重要なホルモンであることが推測され、雄の成熟状態を調べるための指標として有効であると云える。本研究において明らかとなった飼育条件下におけるタイマイ雄の血漿テストステロン濃度の季節変動は、既存の研究報告と一致しており、このような変動はウミガメ類に共通した現象であるといえる。したがって、本研究において2007年の交尾行動の観察結果をもとに区分した2つのグループは、テストステロン濃度の測定結果からも、グループAが性成熟した個体であり、グループBは

未成熟な個体であることを裏付けており、テストステロンが雄の成熟に関する良いバイオマーカーであるといえる。しかしながら、テストステロンを指標として成熟状態を判定する場合、それを使用できる時期が繁殖期に限定されることや測定作業の繁雑さなどの問題がある。

そこで、両グループの直甲長、尻尾長およびTEなどの形態学的な特徴を比較し、それらを用いた雄の性成熟の判定を試みた。直甲長は、成熟個体と未成熟個体の間で重複がみられ、直甲長を指標として両者を区分することはできなかった。尻尾長は成熟個体と未成熟個体の間に重複はみられず、成熟個体の方が明らかに長かったが、両者の値の一部は非常に近接していた。Limpus (1992) は、南グレートバリアリーフに生息するタイマイについて、尻尾の長さを基準として雄の成熟個体を判定することが可能であると報告している。また、van Dam and Diez (1998) はLimpus (1992) の方法を用いてカリブ海に生息する276個体のタイマイの中から成熟した雄を判別している。しかし、本研究では尻尾の長さから性成熟した雄を判別することは困難であった。本研究と既存の研究結果との違いは、それぞれのタイマイが餌料や生息環境などが全く異なっている天然海域と飼育条件であるということに起因していると考えられる。そこで、本研究ではTE(直甲長に対する尻尾長の比率)という新たな指標をもとに供試個体を区分したところ、成熟個体と未成熟個体の間で明瞭に区分され、前者のTEは0.35以上、後者のTEは0.33以下であった。また、成熟個体と未成熟個体の平均血漿テストステロン濃度は13.9 ng/mlと4.6 ng/mlと成熟個体の方が有意に高く(Tukey-Kramer multiple-comparison test, $p < 0.05$)、このことからTEによる性成熟個体の判別は生理学的にも裏付けられたものであるといえる。雄の性成熟を判別する方法としては、血中テストステロン濃度の測定や内視鏡を用いて直接精巣の発達状態を観察する方法(Owens, 1985)などがある。しかし、いずれの方法も繁殖期に限定された方法であり、それ以外の時期においてこれらの手法による性成熟の判別は困難である。一方、本研究で試みたTEを指標とした新たな判別手法は、季節的な制約がなく、特別な機器や技術も必要ないため、誰もが使える簡便な性成熟の判別手法として有効である。

第2章 雌の血漿エストラジオール-17 β 濃度の季節変動と卵胞の発達

人工採卵を行うためには、養成個体の中から成熟

個体を選別し、それらの個体を安定的に交尾させることが重要である。特に本種の雌の産卵周期は2~3年に1度と報告されており(Márquez, 1990)、人工繁殖において性成熟した個体であっても毎年交尾に使用できないと考えられる。したがって、飼育条件下の雌の繁殖周期を明らかにすることが重要であり、雌の性ホルモンの動態と卵巣の発達との関連を調べることが必要である。爬虫類、鳥類およびほ乳類の雌において、エストラジオール-17 β は腺性ステロイド合成の最終生産物であり(Kime, 1987)、爬虫類においてエストラジオール-17 β は卵黄形成に対する第一刺激であることが知られている(Ho, 1987)。ウミガメ類の雌の血中エストラジオール-17 β 濃度に関する研究は、野生のアオウミガメ(Al-Habsi *et al.*, 2006)、アカウミガメ(Wibbels *et al.*, 1990)、オサガメ(Rostal *et al.*, 1996)およびタイマイ(Dobbs *et al.*, 2007)で実施され、飼育条件下においてもアオウミガメ(Licht *et al.*, 1979)やケンブヒメウミガメ(Rostal, 2005)で調査されている。これらの研究において、成熟した雌のエストラジオール-17 β 濃度は交尾期前に上昇すること、産卵期には減少することなどが明らかとなっている。また、未成熟なアオウミガメにエストロゲンを注射することにより、卵管の発達やビテロジェニンの分泌が引き起こされることが実証されている(Owens and Morris, 1985)。また、飼育条件下のケンブヒメウミガメで交尾期前に血中ビテロジェニン量が増大することが確認されている。これらのことから、ウミガメ類におけるエストラジオール-17 β の役割は、卵黄前駆物質であるビテロジェニンの分泌や卵巣の発達に関与していることが示唆される。爬虫類の卵巣の状態は、超音波診断装置によって卵巣内の卵胞(卵巣内にある排卵前の卵子を含むほぼ球形の細胞の集合体)の発達を観察することにより把握することができる(Casares *et al.*, 1997; Tucker and Limpus, 1997; Gilman and Wolf, 2007; Lance *et al.*, 2009)。Rostal *et al.* (1990) は、飼育条件下のケンブヒメウミガメを用いて、腹腔内の卵巣卵や卵殻が形成されている卵の観察結果を詳細に報告している。また、同様の観察は野生のオサガメ(Rostal *et al.*, 1996)やケンブヒメウミガメ(Rostal, 2005)、飼育条件下のタイマイ(Shimizu *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006)でも行われている。しかしながら、血中エストラジオール-17 β 濃度に関する既存の研究は、交尾前から産卵期に至るまでの繁殖期に調査されている事例が多く、1年以上の長期間にわたって調査して卵胞の発達と関連づけた事例はほとんどない(Rostal, 2005)。そこで、本章では2006年10月から2009年10月にかけて飼育条件下のタイマイ雌

を用いて血漿エストラジオール-17β濃度と卵胞の発達を調べ、両者の関係を明らかにした。

材料と方法

供試個体 供試個体の入手は第1章に記載したとおりである。本研究に用いた雌11頭（個体番号、F-1～F-11）の捕獲時の直甲長は41.5～78.5 cmの範囲であり、F-1とF-2の直甲長はそれぞれ78.5 cmと68.4

cm、それ以外の9頭は61.6 cm以下であった（Table 2-1）。捕獲から2006年までの間に4頭は卵胞の発達が確認され、それ以外の7頭は確認されなかった。そこで、本研究に用いた雌11頭のうち、卵胞の発達が確認された4頭（F-1～F-4）は成熟個体、それ以外の7頭（F-5～F-11）は未成熟個体と区分した。

飼育方法 供試個体の養成方法は、與世田、清水（2006）とKobayashi *et al.*（2006）に準じた。本研究における養成方法の概要をTable 2-2に示した。飼育

Table 2-1. Summary of body size of female hawksbill turtles used this study

Female		Straight carapace length (cm)				Growth rate *1
		At the capture (1999-2002)	2007	2008	2009	
Mature	F-1	78.5	82.9	82.4	82.3	-0.6
	F-2	68.4	77.6	77.8	77.9	0.3
	F-3	59.0	73.2	72.8	73.3	0.1
	F-4	53.4	78.4	78.2	79.0	0.6
	Mean	64.8 ± 11.0	78.0 ± 4.0	77.8 ± 3.9	78.1 ± 3.7	0.1 ± 0.5
Immature	F-5	41.5	77.8	78.0	78.6	0.8
	F-6	46.6	76.7	76.8	77.8	1.1
	F-7	55.5	76.1	76.6	77.5	1.4
	F-8	61.6	74.1	74.9	77.4	3.3
	F-9	54.8	64.4	64.2	65.0	0.6
	F-10	49.2	63.6	63.6	64.9	1.3
	F-11	45.5	60.1	60.0	61.8	1.7
	Mean	50.7 ± 6.9	70.4 ± 7.4	70.6 ± 7.6	71.9 ± 7.5	1.5 ± 0.9

Values of straight carapace length shown in the table are for the measurements in January of each year.

*1: Growth rate was a value which subtracted a value of straight carapace length in 2007 from a value of straight carapace length in 2009 in each individual.

Table 2-2. Summary of rearing methods for hawksbill turtles

Rearing tank	Concrete tanks of volumes of 250 kL*1, 200 kL and 110 kL
Sea water	Sand filtered sea water
Water exchange rate	250 kL tank; 20-50%/day, 200 kL and 110 kL tanks; 100-200%/day
Sea water temperature	Natural condition*2
Photoperiod	Natural condition*3
Feed	Anchovy and squid, quantity of 1-2% of turtle body weight
Supplement	Vitamins and calcium powder, quantity of 2.5 % of feed weight
Feeding frequency	3-5 times per week

*1 250 kL tank was connected with an artificial sandy beach and recirculating system.

*2 250 kL tank was kept at 25-26 °C from November to March.

*3 Light periods ranged from 10.6 to 13.6 hours during the experimental periods.

水槽は、人工海浜付き閉鎖循環型250 kL コンクリート製水槽 (Fig. 2-1, 10 × 10 × 2.5 m, 以下, 250 kL 水槽と略す) 1基, 200 kL コンクリート製水槽 (10 × 10 × 2.0 m, 以下, 200 kL 水槽と略す) 1 ~ 2 基および110 kL 水槽2 ~ 4 基を使用した。250 kL 水槽に付属する人工海浜の大きさは, 長さが13 m, 幅が4.7 m, 面積が61.1 m²であった (Fig. 2-1)。また, 人工海浜の砂は当研究所の敷地内に堆積した地先海岸由

来のものを使用し, 砂の深さは1 mとした。200 kL 水槽および110 kL 水槽の水温は自然条件とした。250 kL 水槽の水温は収容した雌の水温低下に伴う摂餌活性の低下を防止するため, 11 ~ 3 月の間の最低水温を25 ~ 26℃に維持し, それ以外の時期は自然条件とした。その他の飼育条件の詳細は, 第1章の材料と方法の飼育方法の項に記載したとおりであり, ここでは概要を簡単に記載する。光周期はいずれの水槽も自然条件と



Fig. 2-1. Photographs of the 250 kL rearing tank (upper) and the artificial sandy beach (lower). A black arrow shows directions from the 250 kL rearing tank to the artificial sandy beach. The tank and the beach are connected by a gradual slope under the rearing water level so that the female turtles can come up onto the beach for nesting.

した。餌料は、総合ビタミン剤とカルシウム剤を展着させたカタクチイワシとマツイカを用い、給餌量は供試個体の体重の1～2%を基準とし、給餌は1週間あたり3～5日とした。

交尾と産卵の観察 交尾試験の方法は、第1章の材料と方法の交尾方法の項に記載したとおりであり、ここでは概要を簡単に記載する。雌雄は別々の水槽で飼育し、3～6月の間に定期的に雄の水槽に成熟した雌を収容して交尾試験を行った。交尾行動は、目視とビ

デオカメラによる観察を行った。交尾の成否は、第1章では雄が精子を受け渡したか否かを確認するため、雌が交尾後に産卵した場合を交尾成功とした。しかし、本節では與世田、清水（2006）の報告に従い、超音波診断装置によって雌の腹腔内を観察し（観察方法は後段に記載した）、卵殻卵（卵巣から排卵された卵子に卵白層（albumen）と卵殻（calcified egg shells）が形成された卵，oviductal egg）の有無で判断した（Fig. 2-2）。すなわち、交尾後に雌の腹腔内に卵殻卵が観察

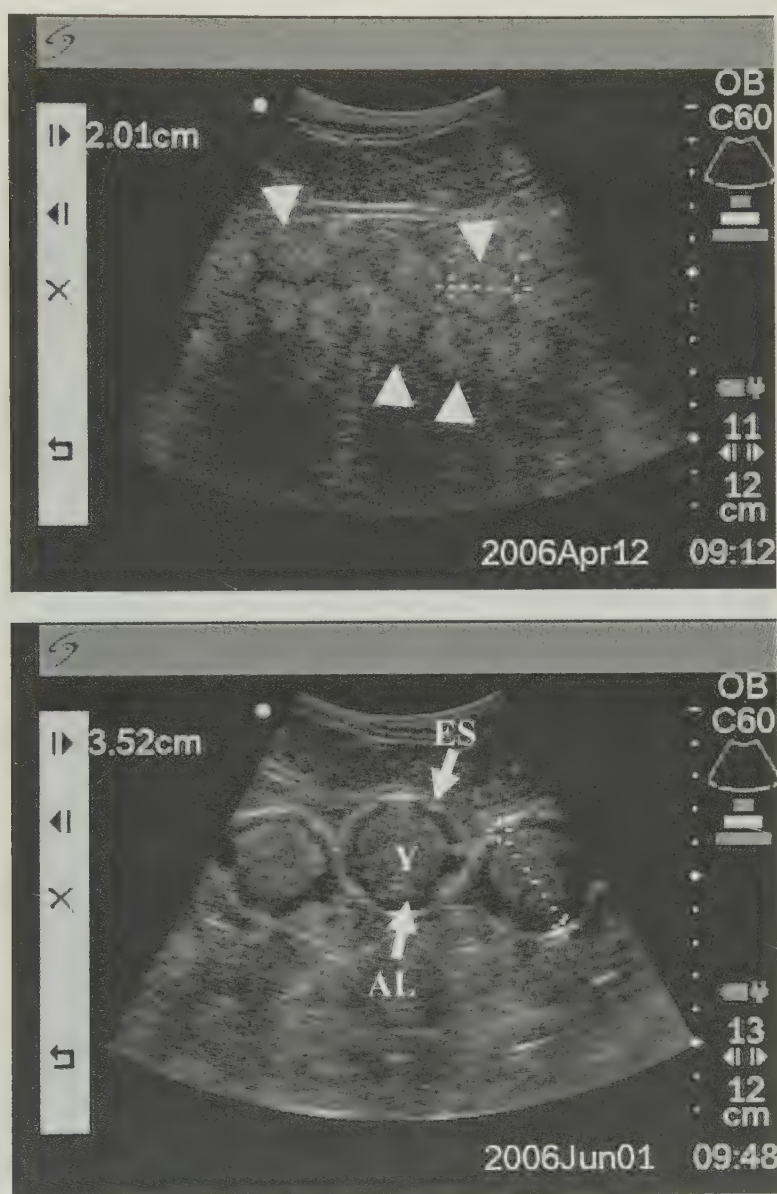


Fig. 2-2. Echo images of vitellogenic follicles (upper) and oviductal eggs (lower) detected by the 180PLUS Ultrasound System. Vitellogenic follicles were identified from the echoic yolk (arrowheads). Oviductal eggs were identified from the echoic yolk (Y), anechoic layer (albumen, AL) and echoic ring (calcified egg shells, ES).

された場合は交尾成功、観察されなかった場合は交尾失敗とした。交尾に成功した雌は250 kL水槽に移槽して産卵行動を観察した。産卵行動の観察は、2台の超高感度ビデオカメラ（ICD-878、池上通信機）を用い、人工海浜の行動を24時間撮影し、その映像をデジタルレコーダー（AV-S7004W、システム エイ・ブイ）に記録した（Fig. 2-3）。映像データは、後日再生して産卵の有無を確認し、産卵日を特定した。

超音波診断 卵胞の発達を調べるため、超音波診断装置（180PLUS Ultrasound System、ソノサイト・ジャパン）を用い、7～30日間隔で雌の腹腔内を観察

した。本研究に用いた超音波診断装置はモニターが付属した本体と超音波を送受信するプローブで構成されている。観察は次のように行った。産卵期は、水槽から取り揚げた雌を淡水が満たされた浅い水槽に収容し、水中で後鰭の付け根から腹腔に向けてプローブを当てて腹腔内を観察した（Fig. 2-4）。産卵期以外は、水槽から取り揚げた雌を緩衝材の上に仰向けにし、後鰭の付け根に超音波診断用のゲル（高粘性トワゲル、東和テクノス）を塗布し、その上からプローブを当てて観察した（Fig. 2-4）。プローブから得られた腹腔内の情報はモニター上にエコー画像として表示される。



Fig. 2-3. Photographs of two highly sensitive cameras fixed on the outside wall (upper) and image of an observation of nesting behavior (lower).

卵胞の状態は、Rostal *et al.* (2005) の報告に準じ、卵胞と卵殻卵に区分して観察した (Fig. 2-2)。卵巣の発達状態の指標として、卵胞と卵殻卵の長径を内蔵されている電子測定機能を用いて測定した。なお、この装置では直径1.0 cm 未満の卵胞は識別できなかった。

採血とホルモン測定 雌11頭の血漿エストラジオール-17 β 濃度を測定するため、毎月1回採血した。採血方法は第2章第1節に記載したとおりである。エストラジオール-17 β の測定は、測定はBMLに依頼し、アーキテクト・エストラジオールキット (ARCHITECT Estradiol II ; アボットジャパン) を

用いた CLIA 法により測定した。エストラジオール-17 β の測定範囲は10~1,000 pg/ml, 交差反応率はエストロンが0.11%, エストラジオール-17 β 3-sulfate が0.7%であり、エストリオールでは交差反応性は検出されなかった。

直甲長の測定 雌11頭の直甲長は毎月1回、ノギス (MA1270BLUE; Haglöf Inc.) を用いて0.1 cm 単位まで測定した。各年の直甲長はその年の1月のデータを用いた。なお、本研究において、試験終了時の2009年1月における直甲長から試験開始時の2007年1月における直甲長を差し引いた値を、試験期間中の成長量と定義した。



Fig. 2-4. Photographs of observation of ovarian status using the ultrasonograph. Upper and lower photo show an observation in the nesting period and the other period, respectively.

結 果

交尾と産卵 試験期間中に F-5から F-11の 7 頭は性成熟しなかったことから、交尾試験には F-1から F-4の 4 頭を使用した (Table. 2-3)。F-1は2007年5月29日に交尾に成功して 3 回の産卵が観察されたが、2008年と2009年は交尾に失敗して産卵しなかった。F-2は試験期間中に交尾も産卵も観察されなかった。F-3は2007年 5 月17日に交尾に成功して 4 回の産卵が観察されたが、それ以外の年には交尾も産卵も観察されなかった。F-4は2009年 5 月21日に交尾に成功して 3 回の産卵が観察されたが、それ以外の年には交尾も産卵も観察されなかった。交尾に成功した時の雌雄の交尾行動は、水槽底面に定位しているか、あるいは前方に向かって遊泳している雌に対し、雄が背後から接近して交尾した。一方、交尾に失敗した場合は、雄が雌の背後から接近すると、雌が雄の方に振り返って対峙、あるいは威嚇して交尾を回避する行動を示し、結果として交尾に失敗した

卵胞の発達 本研究において、卵胞の発達は F-1から F-4までの 4 頭で確認され、F-5から F-11の 7 頭では試験期間中に確認されなかった。

F-1の卵胞の発達は毎年観察された (Fig. 2-5)。卵胞は2006年10月から徐々に退縮し、2007年 1 月から 3

月の間は観察されなかった。2007年 4 月 (平均卵胞径 ± 標準偏差, 1.71 ± 0.10 cm) に再び卵胞が確認され、5 月25日の平均卵胞径は 2.00 ± 0.22 cm に達した。そして、5 月29日に交尾に成功し、6 月22日に卵殻卵 (平均卵殻卵径 ± 標準偏差, 3.66 ± 0.21 cm) が確認され、8 月 3 日までの期間に 3 回の産卵が観察された。産卵期終了後に観察された卵胞は徐々に退縮し、2007年11月から2008年 3 月の平均卵胞径 (± 標準偏差) は 1.50 ± 0.05 cm ~ 1.83 ± 0.33 cm の範囲を推移した。2008年 4 月 (平均卵胞径 ± 標準偏差, 1.66 ± 0.04 cm) から再び卵胞は発達したが、交尾に失敗したために卵殻卵は形成されず、平均卵胞径は 8 月に最大値 (平均卵胞径 ± 標準偏差, 2.48 ± 0.23 cm) に達した。その後、卵胞は退縮して2008年 2 月には最低値 (平均卵胞径 ± 標準偏差, 1.69 ± 0.21 cm) に達した。2009年の卵胞の発達は、2008年と同様の傾向を示した。

F-2は2006年に交尾に成功して産卵し、最後の産卵が終了した10月まで卵殻卵が観察された。そして、2006年11月から2009年 1 月までの間、卵胞は観察されず、2009年 2 月 (平均卵胞径 ± 標準偏差, 1.22 ± 0.32 cm) に再び卵胞が観察された。その後、徐々に卵胞は発達したが、交尾に失敗したために卵殻卵は形成されず、平均卵胞径は 8 月に最大値 (平均卵胞径 ± 標

Table 2-3. Summary of mating and nesting of mature female hawksbill turtles from 2007 to 2009 in captivity

Year	Female	Development of follicles	Mating	Nesting	
				period	Number
2007	F-1	○	29-May	22-Jun to 3-Aug	3
	F-2	×	failure	—	—
	F-3	○	17-May	16-Jun to 2-Sep	4
	F-4	○	failure	—	—
2008	F-1	○	failure	—	—
	F-2	×	failure	—	—
	F-3	×	failure	—	—
	F-4	×	failure	—	—
2009	F-1	○	failure	—	—
	F-2	○	failure	—	—
	F-3	○	failure	—	—
	F-4	○	21-May	20-Jun to 13-Aug	3

Open circles and cross marks indicate that follicles developed and that follicles did not developed, respectively.

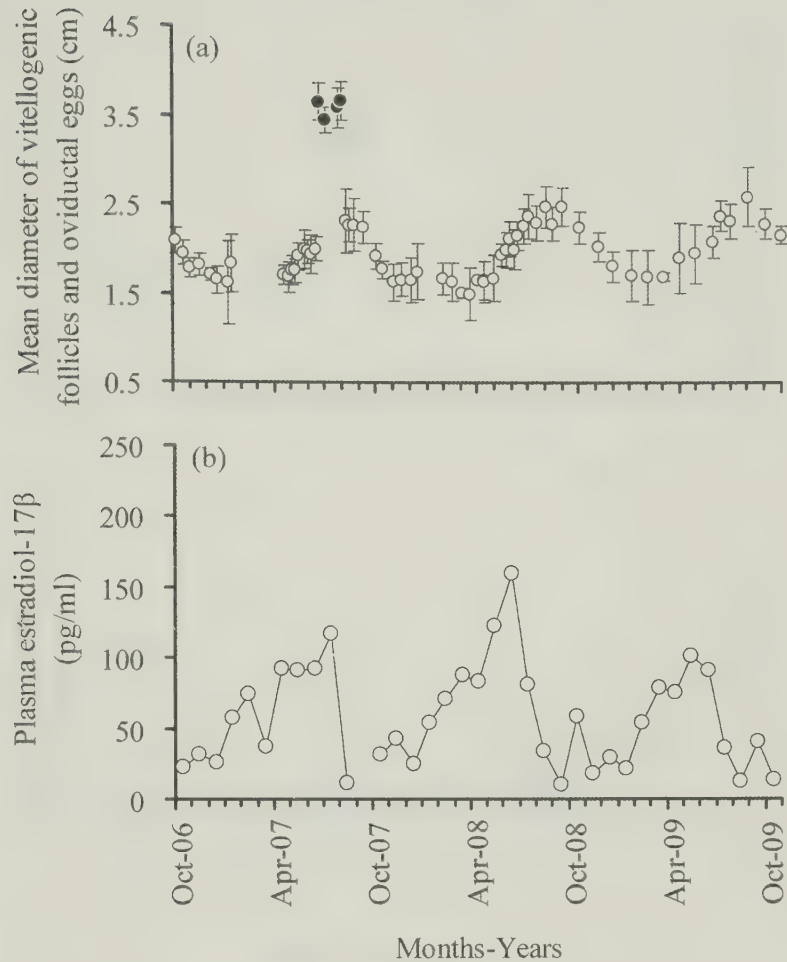


Fig. 2-5. Relationships between development of vitellogenic follicles (a) and changes of plasma estradiol-17 β concentrations (b) in female (F-1) hawksbill turtle. Open circles and closed circles in graph (a) indicate mean diameter of vitellogenic follicles and oviductal eggs, respectively.

準偏差, 2.30 ± 0.09 cm) に達した後, 退縮した (Fig. 2-6)。

F-3の卵胞は, 2006年10月から2007年2月までの間は観察されなかった。2007年3月(平均卵胞径 $\pm$ 標準偏差, 1.64 ± 0.03 cm) から徐々に卵胞は発達し, 5月25日に平均卵胞径 ($\pm$ 標準偏差) は 1.91 ± 0.21 cm に達し, 5月17日に交尾に成功した。5月31日に卵殻卵(平均卵殻卵径 $\pm$ 標準偏差, 3.79 ± 0.28 cm) が確認され, 9月2日までの期間に4回の産卵が観察された。その後に観察された卵胞は急速に退縮し, 2007年12月から2009年1月にかけては卵胞が観察されなかった。その後, 2009年2月に再び卵胞が観察され, 徐々に発達したものの, F-3は交尾に失敗したため卵殻卵は形成されず, 平均卵胞径は10月に最大値

(平均卵胞径 $\pm$ 標準偏差, 2.29 ± 0.18 cm) に達した (Fig. 2-7)。

F-4の卵胞は2006年10月から徐々に退縮し, 2007年1月から4月の間は観察されなかった。2007年2月から再び発達したものの, 交尾に失敗したことから卵殻卵は形成されず, 8月に最大値(平均卵胞径 $\pm$ 標準偏差, 2.20 ± 0.21 cm) に達した。その後卵胞は退縮し, 2007年12月から2009年1月の間は卵胞が観察されなかった。2009年2月に再び卵胞が観察され, 5月21日交尾に成功し, 6月1日に卵殻卵(平均卵殻卵径 $\pm$ 標準偏差, 3.37 ± 0.15 cm) が確認され, その後3回の産卵が確認された (Fig. 2-8)。

血漿エストラジオール-17 β 濃度の変動 F-1の血漿エストラジオール-17 β 濃度は, 毎年規則的な変動

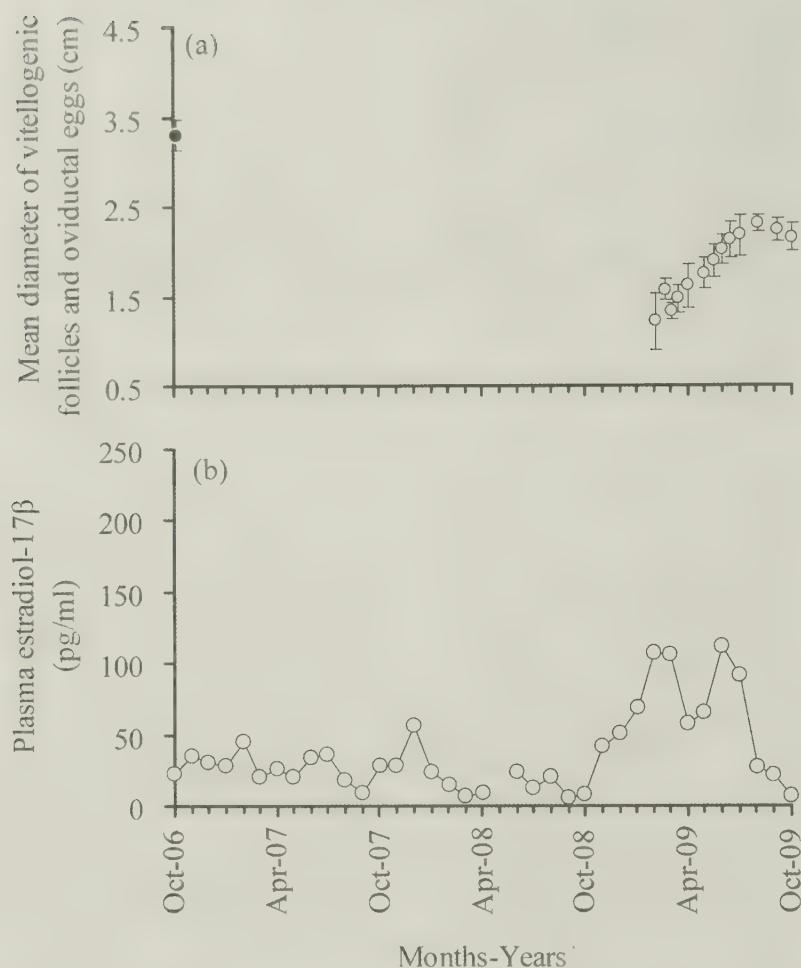


Fig. 2-6. Relationships between development of vitellogenic follicles (a) and changes of plasma estradiol-17 β concentrations (b) in female (F-2) hawksbill turtle. Open circles and closed circles in graph (a) indicate mean diameter of vitellogenic follicles and oviductal eggs, respectively.

を示した (Fig. 2-5)。すなわち、8～10月に最低濃度 (10.3 pg/ml～12.0 pg/ml) を示し、その後は徐々に濃度が増加し、5～6月に最高値 (101.2 pg/ml～160.4 pg/ml) に達した。

F-2の血漿エストラジオール-17 β 濃度は、2006年10月から2008年10月までの間は低濃度 (平均濃度 $\pm$ 標準偏差, 20.0 $\pm$ 12.0 pg/ml) で推移した。そして、2008年11月から濃度が増加し、2009年6月に最高値 (111.2 pg/ml) に達した後、急速に減少した (Fig. 2-6)。

F-3の血漿エストラジオール-17 β 濃度は、2007年1月 (43.2 pg/ml) から濃度が増加し、4月 (113.8 pg/ml) に最高値に達した。その後は急速に濃度が低下し、2007年9月から2008年8月までの間は低濃度 (平

均濃度 $\pm$ 標準偏差, 17.5 $\pm$ 4.8 pg/ml) で推移した。その後、9月 (31.6 pg/ml) から再び濃度が増加し、8月に最高値 (104.7 pg/ml) に達した後、急速に減少した (Fig. 2-7)。F-4の血漿エストラジオール-17 β 濃度の変動パターンは、F-3と同様の傾向を示した (Fig. 2-8)。

以上のように、成熟個体4頭の血漿エストラジオール-17 β 濃度は8～10月に増加しはじめ、3～8月に最大濃度に達し、その後減少するパターンを示した。そして、その増減するリズムは個体によって異なっており、F-1のリズムは毎年観察されたが、F-2～F-4は毎年ではなく、2～3年間隔であった。一方、未成熟個体 (F-5～F-11) の血漿エストラジオール-17 β 濃度は、試験期間中低濃度 (Fig. 2-9, 平均濃度 $\pm$ 標

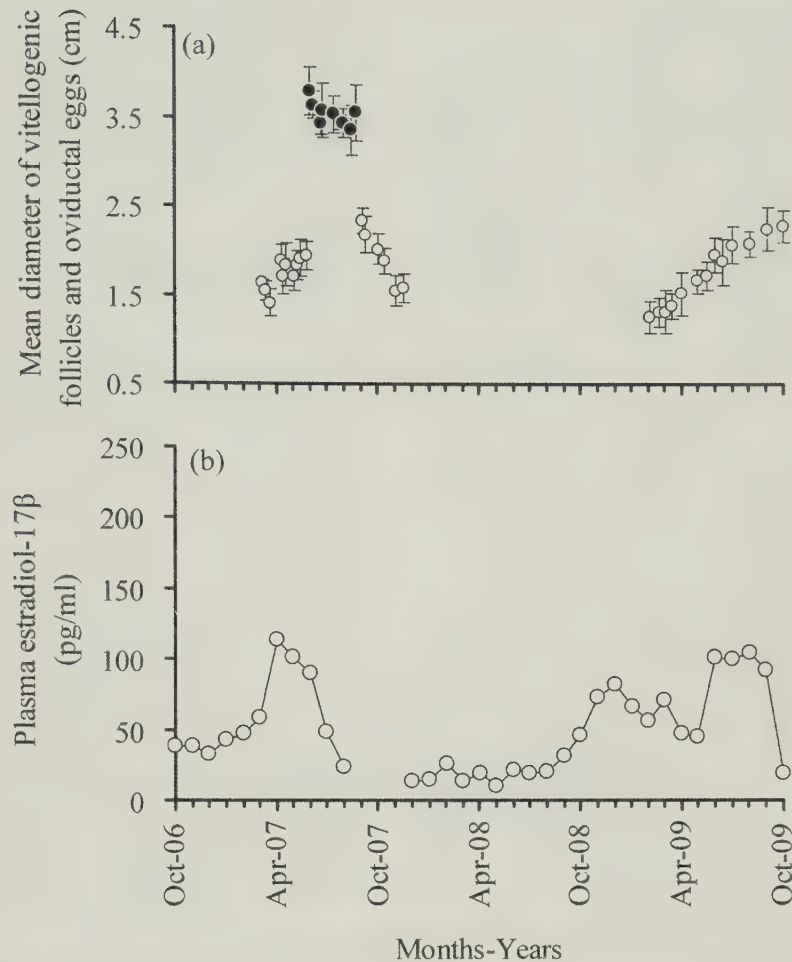


Fig. 2-7. Relationships between development of vitellogenic follicles (a) and changes of plasma estradiol-17 β concentrations (b) in female (F-3) hawksbill turtle. Open circles and closed circles in graph (a) indicate mean diameter of vitellogenic follicles and oviductal eggs, respectively.

準偏差, 18.1 ± 9.0 pg/ml) で推移し, 季節変動は認められなかった。

考 察

爬虫類において, エストラジオール-17 β は卵黄形成に対する第一刺激であることが知られている (Ho, 1987)。それによって肝臓で卵黄前駆物質であるビテロジェニンが生成され, これが血液中を通過して卵巣に運ばれて卵黄タンパクに変換される。そして, 卵胞は最終成熟に向かって発達する。ウミガメ類の血中エストラジオール-17 β 濃度と卵胞の発達の関係を1年以上の長期間にわたって調査した報告はほとんどない (Rostal, 2005)。本研究により, 飼育条件下のタ

イマイ雌の3年間の長期間にわたる卵胞の発達パターンと血漿エストラジオール-17 β 濃度との関係を初めて明らかにすることができた。未成熟個体7頭は, いずれも試験期間中の血漿エストラジオール-17 β 濃度は低レベルで推移して季節変動は認められなかった。また, 卵胞も試験期間を通じて観察することができなかった。これに対し, 成熟個体4頭の血漿エストラジオール-17 β 濃度は交尾5~8カ月前から上昇を開始した。交尾前に血中のエストラジオール-17 β 濃度が上昇するという現象は, 成熟した雌の野生のアカウミガメ (Wibbels *et al.*, 1990) や飼育条件下のケンブリュウミガメ (Rostal, 2005) で観察されており, 本研究の結果は, 既報の研究と一致していた。また, 卵胞の発達は血漿エストラジオール-17 β 濃度の増加と連

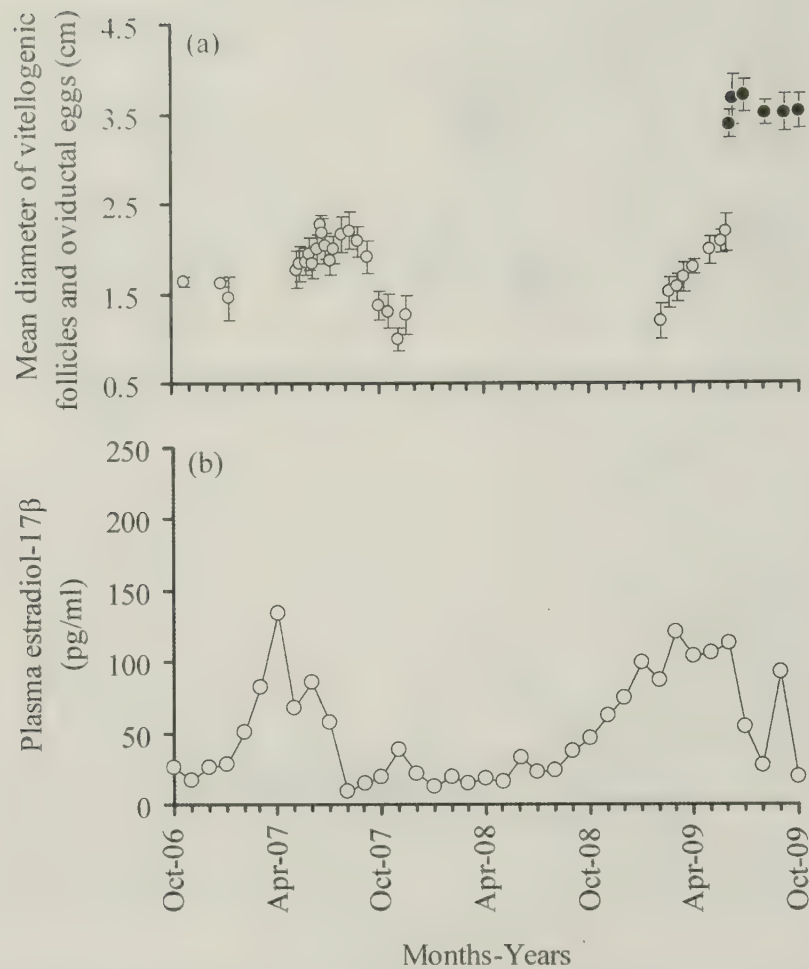


Fig. 2-8. Relationships between development of vitellogenic follicles (a) and changes of plasma estradiol-17 β concentrations (b) in female (F-4) hawksbill turtle. Open circles and closed circles in graph (a) indicate mean diameter of vitellogenic follicles and oviductal eggs, respectively.

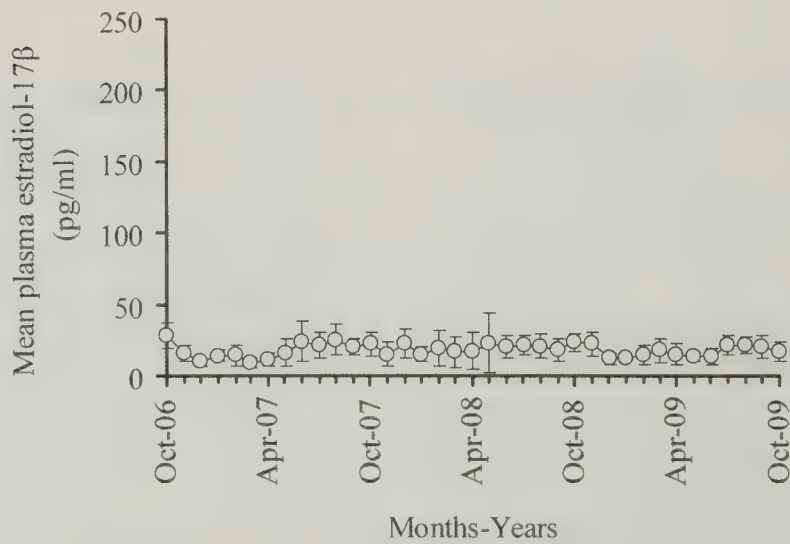


Fig. 2-9. Annual changes of plasma estradiol-17 β concentrations in immature 7 female (F-5 to F-11) hawksbill turtles.

動していたが、発達が確認された時期は交尾1～3カ月前からであり、血漿エストラジオール-17 β 濃度の上昇時期よりも遅かった。本研究に用いた超音波診断装置では直径1 cm以下の卵胞は識別できないことから、卵黄蓄積開始時の小さな卵胞は観察できない。したがって、本研究で卵胞の発達が確認された時期よりも早く、卵胞の発達が起こっていたかもしれない。

血漿エストラジオール-17 β 濃度の増減および卵胞の発達と退縮のリズムは、F-1では毎年観察されたが、F-2～F-4の3頭では2～3年間隔であった。本研究では交尾に失敗して産卵しなかった事例があったため、このリズムを産卵周期とすることができないが、F-2～F-4のリズムは野生のタイマイの産卵周期2～3年と一致しており、飼育条件下においても野生個体と同じ繁殖周期である可能性が示唆された。また、F-1のリズムは毎年であったことから、本種は毎年繁殖する能力を有しているが、餌料や生息環境などによってその能力が制限されているのかもしれない。

交尾は試験期間中に3頭の雌でそれぞれ1回、いずれも5月に観察された。交尾直前(2～3日前)の平均卵胞径は 2.0 ± 0.2 cmで、その範囲は1.7～2.6 cmであった。卵黄形成が完了して卵胞が成熟する時期について、Rostal *et al.* (1996) は産卵期中の産卵回数が10回以上のオサガメは、雌が産卵海域に到着する前に卵黄形成は完了していると報告している。一方、Wibbels *et al.* (1990) は産卵回数が4～10回であるアカウミガメやアオウミガメでは、産卵期初期まで卵黄形成が継続することを述べている。これらの結果は、ウミガメ類の中でも種によって卵黄形成が完了する時期には違いがあることを示唆している。本研究に用いたタイマイの産卵期は6～9月であり、産卵回数は2～4回であった。交尾直前の卵胞径は1.7～2.6 cmと大小様々な卵胞が観察され、血漿エストラジオール-17 β 濃度は6～7月まで高い濃度を維持していた。これらの結果から、タイマイの卵黄形成は、産卵期前に全てが完了はしておらず、産卵初期から中期まで継続していると推測された。興味深いことに、交尾に失敗した事例では、平均卵胞径は交尾期以降も徐々に増大し、8～10月に最大になった。この現象は、卵胞は排卵されずに成熟未完了のまま、血中に分泌されているビテロジェニンを取り込んで卵黄形成が進行し、段階的に成熟した結果であると推察された。これは、タイマイの卵黄形成が産卵期間中であっても進行する可能性を示唆する結果である。

成熟個体の血漿エストラジオール-17 β 濃度は、交尾の成否にかかわらず、6～7月から減少した。産卵期中に血中エストラジオール-17 β 濃度が減少するこ

とは、野生のアオウミガメ (Al-Habsi *et al.*, 2006)、アカウミガメ (Wibbels *et al.*, 1990)、オサガメ (Rostal *et al.*, 1996) およびタイマイ (Dobbs *et al.*, 2007) で報告されており、飼育条件下のケンブリュウミガメ (Rostal, 2005) やアオウミガメ (Licht *et al.*, 1979) でも観察されている。これらの研究結果から、産卵期間中に血中エストラジオール-17 β が減少することは、野生であるか飼育されているかにかかわらず、ウミガメ類に共通してみられる現象であろう。一方、卵胞の退縮は、交尾に成功した場合には産卵期終了後(7～9月)に、交尾に失敗した場合には8～10月に、それぞれ観察された。血漿エストラジオール-17 β 濃度が減少した後も卵胞の大きさが維持されることに関して、Al-Habsi *et al.* (2006) は、成熟した卵胞を維持するために、エストラジオール-17 β は低濃度で十分であるということ、一つの可能性として示唆している。しかし、本研究では成熟した卵胞を維持するために、血漿エストラジオール-17 β が必要かどうかということをはっきりとすることはできなかった。このことを明らかにするためには、エストラジオール-17 β 以外の黄体形成ホルモンやプロゲステロン、血中のビテロジェニン濃度などの動態についても調査を行う必要がある。

第3章 飼育条件下におけるタイマイの繁殖生態

飼育条件下でのウミガメ類の繁殖生態に関する研究では、アオウミガメ (Simon *et al.* 1975; Wood and Wood, 1980) やケンブリュウミガメ (Shaver and Wibbels, 2007) において産卵数やふ化率が野生個体と異なる事例が報告されている。一方、タイマイでは、野生個体の産卵調査は世界各地で行われているが (Witzell and Banner, 1980; Limpus *et al.*, 1983; Bjorndal *et al.*, 1985; Wood, 1986; Moncada *et al.*, 1999; Pilcher and Ali, 1999; Hitchins *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2006; Rérez-Castañeda *et al.*, 2007; Kamel and Delcroix, 2009)、飼育条件下における本種の産卵に関しては、当研究所での事例以外に公表された報告はない (Shimizu *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006)。また、本種の交尾に関しても、Márquez (1990) が野生個体の事例を取りまとめ、数時間のマウント行動が観察されたという報告しかなく、飼育条件下では Kobayashi *et al.*, (2006) の報告以外は公表されていない。そこで、本章では、飼育条件下におけるタイマイの繁殖生態について、2006年から2009年までの交尾時間、産卵数、産卵回数、産卵間隔およびふ化について取りまとめるとともに、これまで報告され

ている野生タイマイの繁殖生態と比較した。

材料と方法

供試個体 供試個体の入手方法は第1章に記載したとおりである。本研究で交尾試験に使用した供試個体は、次に述べる方法で選別した。雄は、前年に交尾行動を示した個体を使用した。雌は、超音波診断装置による卵巣の観察を行い（観察方法は、第2章の材料と方法の超音波診断の項を参照）、1～3月に卵胞の発達が確認された個体を使用した。供試個体の直甲長はノギス（MA1270BLUE, Haglöf Inc.）で0.1 cm単位まで、体重は台ばかり（DS-100型, 大和製衡）で0.1 kg単位まで、1～2カ月間隔でそれぞれ計測した。なお、本研究では各年の1月に測定したデータをその年の供試個体の大きさとした。

飼育方法 供試個体の飼育方法の詳細は、第1章の飼育方法に記載したとおりであり、ここでは概要を簡単に記載する。飼育水槽は、250 kL水槽1基、200 kL水槽1～2基および110 kL水槽2～4基を使用した。飼育水温は、250 kL水槽で11～3月の間の最低水温を25～26℃に維持した以外は、全て自然条件とした。光周期はいずれの水槽も自然条件とした。餌料は総合ビタミン剤とカルシウム剤を展着させたカタクタイワシとマツイカとし、給餌量は供試個体の体重の1～2%を基準とし、給餌は1週間あたり3～5日とした（Table. 2-2）。

交尾と産卵の観察 交尾試験は、2006年は250 kL水槽で行い、2007年以降は110 kL水槽で行った。2006年は成熟した雄1頭と雌3頭を周年同居させて飼育し、水槽側壁にある2つの観察窓から2台の超高感度ビデオカメラ（ICD-878, 池上通信機）で水槽内の行動を24時間撮影し、その映像データをデジタルレコーダー（AV-S7004W, システム エイ・ブイ）に記録した（Fig. 3-1）。その後、映像を再生して交尾行動、交尾日、交尾時間などを調べた。2007年以降の交尾行動の観察は、第1章の材料と方法の交尾方法の項に記載したとおりである。交尾に成功した雌は、産卵場となる人工海浜が接続した250 kL水槽に移し、産卵行動を観察した。なお、2006年は250 kL水槽で雌2頭が交尾に成功したことから、引き続き産卵行動の観察を行った。

産卵行動の観察は、2台の超高感度ビデオカメラで人工海浜での産卵行動を24時間撮影し、産卵日を特定した。また、産卵前後の卵殻卵の有無を確認するため、超音波診断装置を用いて1～2週間の間隔で雌の腹腔内を観察した。なお、本研究では、産卵数（clutch

size）は雌1個体が1回に産卵した卵数、産卵間隔（internesting interval）は産卵した翌日から起算して次の産卵日の前日までの日数、産卵回数は雌1頭がある年の産卵期に産卵した回数、とそれぞれ定義した。

卵管理とふ化 本研究では、供試個体が人工海浜に上陸して産卵巣を掘って産卵する場合と水槽内で卵を放出する場合が観察されたことから、前者を産卵（nesting）、後者を水中放卵（release）と定義した。人工海浜に産卵された卵は、原則として、全数掘り出して卵数を計数した。その後、光ファイバー照明装置（KTX-100, ケンコー）を用いて卵に光を当て、透けて見える卵内の胚や血管の形成状態から卵の生死を判断した。掘り出した卵から死亡が確認された卵を除き、残りの卵をプラスチック容器（直径27 × 高さ40 cm, TOS003, トスロン）に収容し、湿らせた人工海浜の砂で埋設した。卵管理時の温度を一定に保つため、恒温器（内寸60 × 58 × 62 cm, SSFR-116, いすゞ製作所）の中に卵を収容したプラスチック容器を設置した。しかし、恒温器が使用できなかった2例では、コンテナボックス（内寸61 × 31 × 31 cm, サンボックス #75, 三甲）に淡水を満たしたウォーターバス式の恒温槽を用意し、その中にプラスチック容器を設置した。恒温器で管理する場合は、庫内温度を29℃に維持し、庫内湿度は100%以上になるよう水道水を入れた容器を庫内に設置した。恒温槽で管理する場合は、水温を29℃に維持し、湿度調整は行わず、砂の表面を1日数回霧吹きで湿らせた。なお、台風の最中に産卵した1事例においては、暴風雨のためビデオ観察でも産卵巣を特定できなかったため、人工海浜でそのままふ化まで卵管理した。人工海浜から卵を掘り出す時期は、掘り出しや移動に伴うハンドリングの影響を避けるため、産卵から4～5週間後とした。ふ化仔ガメの直甲長はデジタルノギス（CD-20PM, ミットヨ）を用いて0.1 mm単位まで、体重は台ばかり（HL-300WP-K, エー・アンド・デイ）を用いて1 g単位まで計測した。

統計処理 産卵個体の直甲長および体重に対する産卵数との相関はピアソン相関係数検定を用い、交尾時間、産卵数および産卵回数とふ化率との相関はスピアマン順位相関係数検定を用い、いずれの場合も有意水準5%で検定した。また、産卵回次ごとの平均ふ化率、ふ化仔ガメの平均直甲長および平均体重の変動は、クラスカル・ウォリス検定を用い、有意水準5%で検定した。全ての検定は、表計算ソフト（エクセル2002, マクロソフト）のアドインソフト STATCEL2 (4 Steps エクセル統計, オーエムエス出版) を用いて行った。



Fig. 3-1. Photographs of a highly sensitive camera fixed on the edge of the observation window (upper) and image of an observation of mating behavior in the 250kL tank (lower).

結 果

交尾と産卵 Table. 3-1に各年に交尾に成功した雌雄個体の組み合わせと各個体の直甲長及び体重（各年の1月のデータ）、交尾日、交尾回数および交尾時間を示す。2006年は2頭（F-1, 2）、2007年は2頭（F-2, 4）および2009年は1頭（F-5）が交尾に成功し、産卵した。また、2008年に雌1個体（F-3）が交尾に成功して産卵したが、産卵期間中に死亡したため、この個体のデータは本研究では使用しなかった。交尾は、2006年は4月24日と5月3日に、2007年は5月17日と29日に、

2009年は5月21日に観察された（Table. 3-1）。交尾の平均時間（ $\pm$ 標準偏差）は 90 ± 43.0 分（ $n = 5$ ）で、その範囲は50～150分であった。2006年は雌2頭（F-1, F-2）が交尾に成功し、その後も継続して雄と同居させたが、両個体ともにその後は雄と交尾せず、結果としていずれの雌も交尾回数は交尾に成功した時の1回のみであった。2007年以降は110 kL 水槽で交尾に成功した後は、雄と隔離したことから交尾回数はいずれも1回であった。

各年の各雌個体の産卵の概要を Table. 3-2に示す。2006～2009年に雌4個体が産卵し、F-2のみは2年連

Table 3-1. Summary of mating of captive hawksbill turtles from 2006 to 2009

Year	Combinations of female and male						Mating		
	Female			Male					
	Ind.	Straight carapace length (cm)	Body weight (kg)	Ind.	Straight carapace length (cm)	Body weight (kg)	Date	No. of times	Duration (minutes)
2006	F-1	77.3	69.7	M-1	82.6	75.2	4/24	1	70
	F-2	82.9	71.2	M-1	82.6	75.2	5/3	1	120
2007	F-2	82.9	66.8	M-1	82.8	77.2	5/29	1	60
	F-4	73.2	55.0	M-2	73.2	46.0	5/17	1	50
2009	F-5	79.0	63.2	M-2	74.2	45.8	5/21	1	150

Values of straight carapace length and body weight shown in the table are for the measurements in January of each year.

Table 3-2. Summary of egg laying by captive female hawksbill turtles during the breeding season from 2006 to 2009

Year	Ind.	1st			2nd			3rd			4th			5th			6th		
		Days after mating	No. of eggs	Status* ¹	Day after 1st	No. of eggs	Status* ¹	Days after 2nd	No. of eggs	Status* ¹	Days after 3rd	No. of eggs	Status* ¹	Days after 4th	No. of eggs	Status* ¹	Days after 5th	No. of eggs	Status* ¹
2006	F-1	31	137	Nesting	15	168	Nesting	21	Unknown	Release	14	156	Nesting	21	Unknown	Release	* ²	Unknown	Release
	F-2	33	114	Nesting	18	162	Nesting	18	173	Nesting	* ²	Unknown	Release						
2007	F-2	24	131	Nesting	21	132	Nesting	21	153	Nesting									
	F-4	30	86	Nesting	15	119	Nesting	17	116	Nesting	46	100	Nesting						
2009	F-5	30	126	Nesting	17	139	Nesting	23	Unknown	Release	14	162	Nesting	* ²	Unknown	Release			
Mean		29.6	118.8		17.2	144.0		18.7	147.3		24.7	139.3							

Mean values were calculated using only data of nesting.

^{*1} Nesting and release mean that female laid eggs on the artificial beach connected with rearing tank and female released eggs in the rearing tank, respectively.

^{*2} The release date could not be specified.

続で産卵したことから、合計 5 事例が観察された。産卵回数は合計16回、水中放卵の回数は合計 6 回であった。

交尾から初回産卵までの平均日数（± 標準偏差）は29.6 ± 3.4日（*n* = 5）、その範囲は24～33日であった（Table. 3-2）。初回産卵以降の平均産卵間隔（± 標準偏差）は20.9 ± 9.7日間（*n* = 9）、その範囲は15～46日間であった（Table. 3-3）。他の事例と比較して極端に長い46日間の産卵間隔は、2007年の F-4の 3 回目と 4 回目の産卵間隔であり、1 例のみ観察された。この時の 3 回目から 4 回目の産卵までの期間、超音波診断装置による卵殻卵の観察を行ったところ、3 回目

の産卵後に形成された卵殻卵は13日後までは確認できたが、22日後に 1 度観察できなくなり、26日後に再び卵殻卵が確認され、46日後に産卵に至るという経過であった。

平均産卵数（± 標準偏差）は135.9 ± 25.2個（*n* = 16）で、その範囲は86～173個であった（Table. 3-3）。産卵個体の直甲長および体重と産卵数との関係を Fig. 3-2に示す。産卵個体の直甲長および体重と産卵数の間には、有意な正の相関が認められた（直甲長；*r* = 0.55, *p* < 0.05, 体重；*r* = 0.71, *p* < 0.05）。

平均産卵回数（± 標準偏差）は、水中放卵が観察された個体の事例を除いて算出したところ、3.5 ± 0.7

Table 3-3. Summary of nesting of captive female hawksbill turtles from 2006 to 2009 during the breeding season

	<i>n</i>	Mean ± SD	Range
Clutch size (eggs)	16	135.9 ± 25.2	86-173
Number of clutches per female*	2	3.5 ± 0.7	3-4
Interesting interval (days)	9	20.9 ± 9.7	15-46

* Data of females which released eggs in the rearing tank (see Table 3-2) were not included.

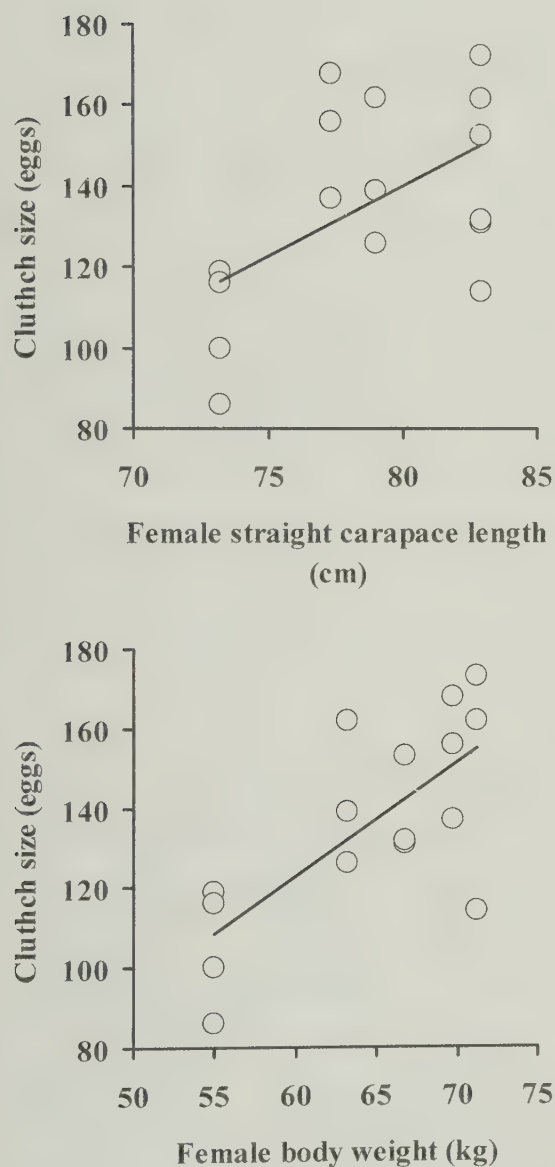


Fig. 3-2. Relationships between female straight carapace length (upper) and body weight (lower) and clutch size of the hawksbill turtle in captivity. Nesting behaviors (*n* = 16, see Table 3-2) were observed in the breeding seasons from 2006 to 2009.

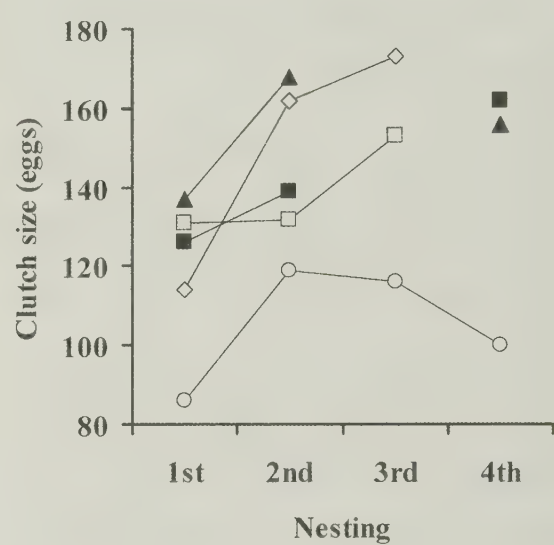


Fig. 3-3. Relationship between the number of nesting and clutch size of each captive female hawksbill turtle. The data were collected during the breeding seasons from 2006 to 2009. Different symbols indicate different females which laid eggs.

回 (*n* = 2) で、その範囲は3～4回であった (Table 3-3)。また、産卵回数に対する産卵数はいずれの事例においても、初回産卵より2回目の方が多かった (Table. 3-2, Fig. 3-3)。その後は、個体によって、さらに産卵数が増加する場合と減少する場合に分かれた。

本研究で観察された水中放卵には、2つのパターンがみられた。1つは、人工海浜に上陸するものの産卵には至らず、その後全ての卵殻卵が水槽内に放出され、しかもその水中放卵は産卵期間中に観察されるパターンで、3事例 (Table. 8, 2006年のF-1の3、5回目, 2009年のF-5の3回目) が観察された。もう一つは、人工海浜に上陸することなく、長期間にわたって数個ずつ水槽内に放卵し、しかもその水中放卵は産卵終息期に観察されるパターンで、3事例 (Table. 3-2,

2006年のF-1の6回目とF-2の4回目、2009年のF-5の5回目）が観察された。超音波診断装置を用いた腹腔内の観察結果では、前者の場合は水中放卵1～4日後には新たな卵殻卵の形成が確認されたが、後者の場合には新たな卵殻卵は観察されなかった。

ふ化 2006～2009年に合計2,174個の卵が産卵され、合計495個体の仔ガメが得られた（Table. 3-4）。全16回の産卵のうち、全くふ化しなかった事例が1回、残り15回の事例でふ化した仔ガメは1～83個体の範囲であった。全16回の平均ふ化率（± 標準偏差）は21.9 ± 13.0%，その範囲は0.0～67.2%であった。交尾時間、産卵数および産卵回数とふ化率の相関を調べたが、有意差は認められなかった（ $p > 0.05$ ）。また、産卵回数ごとの平均ふ化率（± 標準偏差）は、1回目では17.7 ± 28.1%（ $n = 5$ ）、2回目が23.8 ± 25.4%（ $n = 5$ ）、3回目が33.0 ± 28.0%（ $n = 3$ ）、4回目では19.1 ± 18.5%（ $n = 3$ ）と、1回目から3回目にかけて徐々に平均ふ化率は上昇し、4回目で低下した。しかし、その変動に有意な差は認められなかった（ $p > 0.05$ ）。

全ふ化仔ガメの平均直甲長（± 標準偏差）は37.5 ± 1.7 mm、平均体重（± 標準偏差）は12.9 ± 0.6 gであった。産卵回数ごとのふ化仔ガメの平均直甲長（± 標準偏差）は、1回目では36.9 ± 2.5 mm（ $n = 3$ ）、2回目が38.9 ± 2.7 mm（ $n = 4$ ）、3回目が39.0 ± 0.5 mm（ $n = 3$ ）、4回目では37.5 ± 1.7 mm（ $n = 3$ ）と、1回目よりも2～3回目の方が大きくなり、4回目には再び小さくなった。また、産卵回数ごとのふ化仔ガ

メの平均体重（± 標準偏差）も、1回目では12.4 ± 0.8 g（ $n = 3$ ）、2回目が13.3 ± 1.6 g（ $n = 4$ ）、3回目が13.6 ± 0.2 mm（ $n = 3$ ）、4回目では12.5 ± 1.2 mm（ $n = 3$ ）と直甲長と同様の変動を示した。しかし、いずれの変動にも有意差は認められなかった（ $p > 0.05$ ）。

考 察

交尾 本研究では、供試個体を個体識別し、交尾を雌雄1個体ずつの組み合わせとして1回の交尾に限定したことから、全ての雌個体の交尾や産卵の日時を特定することができた。その結果、平均交尾時間が90.0 ± 43.0分であることが明らかになった。Márquez (1990) は、野生のタイマイでは雄が爪や尻尾を使って雌を押さえ込む状態を数時間続けると報告しているが、正確な時間は把握されていない。Wood and Wood (1980) は、アオウミガメの雌71頭の飼育条件下における交尾と産卵行動を観察し、交尾後に雌が産卵した場合の平均交尾時間は25.5時間、産卵しなかった場合の平均交尾時間は1.4時間であったと報告している。本研究では、交尾時間の範囲は50～150分であった。雄が交尾する目的は雌に精子を渡すことであるから、アオウミガメはタイマイよりも精子の受け渡しに時間がかかっている可能性が考えられる。本研究では、上述したアオウミガメよりも極めて短い交尾時間にもかかわらず、全個体から受精卵が得られていることから、精子の受け渡しはこの時間内で完了していると推測される。ウミガメ類の雄の射精に関する知

Table 3-4. Summary of hatching of the hawksbill turtle from 2006 to 2009

Year	Female	Total eggs	Hatchlings		Hatching rate		Hatchling size	
			Total	Range	Mean (%)	Range (%)	Mean Straight carapace length (mm)	Mean Body weight (g)
2006	F-1	461	71	15-38	15.5 ± 8.0	8.9-24.4	39.1 ± 0.3	13.5 ± 0.1
	F-2	449	126	0-78	24.9 ± 22.9	0.0-45.1	38.9 ± 0.5	13.6 ± 0.1
2007	F-2	416	172	3-83	40.8 ± 34.1	2.3-67.2	38.6 ± 1.2	13.2 ± 0.9
	F-4	421	97	1-78	21.2 ± 30.2	0.9-65.5	36.1 ± 0.2	12.0 ± 1.2
2009	F-5	427	29	5-18	6.9 ± 5.3	3.0-12.9	36.1 ± 1.9	12.3 ± 1.2
Mean					21.9 ± 13.0		37.5 ± 1.7	12.9 ± 0.6

見はほとんどないが、両種の交尾時間の違いは、雄の射精までの時間や交尾1回あたりの射精回数の違いが影響しているかもしれない。

本研究における交尾から初回産卵までの日数は、平均 29.6 ± 3.4 日、その範囲は24~33日であった。交尾から初回産卵までに至る日数に関しては、タイマイをはじめ野生個体の報告はなく、飼育条件下のアオウミガメで1例が報告されているだけである (Ulrich and Parkes, 1978)。Ulrich and Parkes (1978) は、アオウミガメの交尾から初回産卵に至る日数は、雌10頭中8頭が21~39日、2頭が68~95日であったと報告している。その日数が68~95日と長い2事例について、彼らはその原因を言及していないが、産卵回数が他の個体の半分程度であり、しかもふ化率が0%であったことから、この2事例は特異的な事例であると推察される。この2事例以外の日数は21~39日であることから、本研究の結果と大きな違いはなく、飼育条件下のウミガメ類の交尾から初回産卵までの日数は、種が異なってもおよそ1カ月前後であると推測される。

産卵 本研究では、2006~2009年に雌4個体が交尾に成功し、合計16回の産卵が観察された。

野生のタイマイの平均産卵数は、セイシェル共和国クーザン島での観察事例では 163.3 ± 34.3 個 ($n = 127$, Wood, 1986)、コスタリカ共和国158 $\pm$ 29個 ($n = 93$, Bjorndal *et al.*, 1985)、サモア独立国ウボル島 149.6 ± 41.7 個 ($n = 23$, Witzell and Banner, 1980)、メキシコ合衆国ユカタン半島149個 ($n = 455$, Xavier *et al.*, 2006、以下「 $\pm$ 標準偏差」を記していないデータは平均値のみを示す)、キューバ列島 135.2 ± 0.7 個 ($n = 512$, Moncada, 1999)、オーストラリア連邦キャンベル島 131.8 ± 22.9 個 ($n = 47$, Limpus *et al.*, 1983)、マレーシアでは 105.3 ± 27.7 個 ($n = 5016$, Pilcher and Ali, 1999) とそれぞれ報告されている。一方、本研究の飼育個体の平均産卵数は 135.9 ± 25.2 個であり、野生個体と大きな違いはなかった。また、産卵個体の大きさと産卵数との関係は、野生個体では直甲長が大きいほど産卵数は多くなる傾向が報告されている (Limpus *et al.*, 1983; Witzell, 1985)。飼育個体でも産卵個体の直甲長および体重と産卵数の間には正の相関が認められ、野生個体の事例と一致していた。

野生のタイマイの平均産卵回数は、セイシェル共和国クーザン島での観察事例では 3.1 ± 1.7 回 ($n = 48$, Wood, 1986)、マレーシア2.7回 ($n = 1161$, Pilcher and Ali, 1999)、メキシコ合衆国ユカタン半島では2.4回 ($n = 37$, Xavier *et al.*, 2006) とそれぞれ報告されている。また、Márquez (1990) がまとめた本種の主

要な産卵地の平均産卵回数は2.7回であった。本研究の飼育個体の産卵回数は 3.5 ± 0.7 回と野生個体よりもわずかに多いものの、大きな違いは認められなかった。しかし、Wood and Wood (1980) は、飼育条件下におけるアオウミガメの産卵回数は野生個体よりも2~5回も多いと報告している。野生のアオウミガメは海草を主食としているが、彼らは飼育個体にペレットを与えていることから、餌料の違いが産卵回数の違いに影響している可能性を示唆している。タイマイは海綿動物が主食であるが、本研究ではカタクチイワシやイカを与えている。アオウミガメの事例と同様に、本研究に用いたタイマイも野生個体よりも栄養価の高い餌料を摂餌していると考えられるが、産卵回数は増加しなかった。野生のアオウミガメとタイマイの産卵個体の平均直甲長は、それぞれ99.1 cm と78.6 cm と報告されている (Miller, 1997)。本研究の産卵個体の平均直甲長は78.1 cm と野生個体とはほぼ同じサイズであった。Wood and Wood (1980) が用いたアオウミガメの直甲長は報告されていないが、野生個体と同程度のサイズであったと仮定すると、アオウミガメの方がタイマイよりも大きく、産卵に必要なエネルギーをより多く蓄積できる可能性があり、そのことが産卵回数の増加につながったかもしれない。

産卵数と産卵回数との関係をみると、本研究の飼育個体は初回産卵よりも2回目以降の産卵数が増加した。Limpus *et al.* (1983) はオーストラリアにおける野生のタイマイの産卵調査において産卵回数が増加しても産卵数はほぼ一定であることを報告している。また、Wood (1986) はセイシェル共和国における野生個体の調査結果から産卵回数が増えるとともに産卵数は減少する傾向があり、5回目からは急激に減少したと報告している。いずれの報告においても、野生個体では産卵回数の増加に伴う産卵数の増加は認められていない。これらのことから、初回産卵よりもその後の産卵数が増加する傾向は、飼育条件下における特異的な現象である可能性が高い。

野生のタイマイの平均産卵間隔は、キューバ列島での観察事例では 19.5 ± 1.6 日間 ($n = 4$, Moncada, 1999)、マレーシア 18.0 ± 7.1 日間 ($n = 1,235$, Pilcher and Ali, 1999)、メキシコ合衆国ユカタン半島 17.5 ± 2.4 日間 ($n = 27$, Xavier *et al.*, 2006)、コスタリカ共和国 16.4 ± 2.1 日間 ($n = 28$, Bjorndal *et al.*, 1985)、オーストラリア連邦キャンベル島 14.7 ± 1.0 日間 ($n = 27$, Limpus *et al.*, 1983)、セイシェル共和国クーザン島では 14.4 ± 1.1 日間 ($n = 82$, Wood, 1986) とそれぞれ報告されている。一方、本研究の飼育個体の産卵間隔は 20.9 ± 9.7 日間であり、野生個体

の事例よりも長かった。しかし、本研究では1事例だけ46日間と最も長い産卵間隔があり、これは後述するように正常な産卵間隔ではない可能性があった。そこで、この46日間のデータを除いて計算すると産卵間隔は 17.8 ± 2.3 日間、その範囲は15~21日間となり、野生個体と同等の結果となった。本研究でみられた46日という産卵間隔の場合は、産卵後に形成された卵殻卵が途中で観察できなくなり、その後再び卵殻卵が観察されて46日後に産卵に至っている。前回の産卵から46日後に産卵するまでの間に産卵も水中放卵も確認されなかったため、途中で卵殻卵が観察できなくなった原因は明らかにできなかった。しかし、前回の産卵から13~22日後の間に卵殻卵が観察されなくなっていること、この時期はほかの産卵個体の事例から推測すると産卵予定にあたること、および産卵28日後に再び卵殻卵が観察されていることなどから、前回の産卵後に何らかの原因により産卵できなかったと考えられ、46日間という産卵間隔は、2回分の産卵間隔であると推察された。

本研究では、合計6回の水中放卵が観察され、これは産卵と水中放卵を合わせた22回のうちの約27%に相当した。Beyneto and Delcroix (2005) は、野生のタイマイやアオウミガメで水中放卵が観察されたことを報告しており、タイマイの事例では20~25分間に100個以上の水中放卵が観察されている。したがって、水中放卵は、飼育個体特有の現象ではないといえる。野生個体の水中放卵の頻度やその原因に関する報告はなく、Beyneto and Delcroix (2005) も水中放卵の原因までは特定していない。本研究では、産卵期間中の水中放卵では、放卵後に新たな卵殻卵が形成されていることから、何らかの原因で産卵する時機を逸し、次の産卵に向けて新たな卵殻卵を形成する前に、前回産卵できなかった卵殻卵を排出している現象と推測された。産卵の時機を逸する原因の一つとして、産卵場所の選択が考えられる。ウミガメの産卵に適した場所の条件として、自然の海浜では砂浜と陸上の海浜植物との境目が挙げられる（特定非営利活動法人日本ウミガメ協議会, 2007）。実際に、沖縄県石垣島で2007年に調査したアカウミガメやアオウミガメの産卵巣は、砂浜と海浜植物の境目で多く観察された（小林真人, 未発表）。一方、本研究で産卵場に供した人工海浜は、水槽から産卵場の奥まで傾斜がなく平坦であり、海浜植物もない。そのため、上陸したタイマイが産卵場所を特定することができないまま産卵予定日が経過したことが、水中放卵の一因として考えられる。しかし、16回は正常に産卵していることから、水中放卵の要因はこれ以外にもあると考えられる。また、産卵終息期

に観察された水中放卵では、人工海浜に上陸することもなく、長期間にわたって少量ずつ放卵した。産卵終息期は水温が高くなり、日照時間も短くなっている。このような環境変化が体内の産卵に関連したホルモン濃度の低下を引き起こし、卵殻卵を形成しても産卵のために上陸するという行動が起こらず、水中放卵したという可能性が考えられる。本研究では本種の産卵に関連した黄体形成ホルモンやプロゲステロンなどの動態は調査しておらず、既存の研究においても水温や日長などの環境要因と産卵との関係は明らかにされていない。水中放卵を防除する技術を開発するためには、本研究で指摘した産卵場の環境の他、水温や日長などの環境要因と産卵に関連したホルモンとの関係を解明する必要がある。

ふ化 2006~2009年に合計16回の産卵があり、そのうちの15回でふ化仔ガメが得られたが、ふ化率は $21.9 \pm 13.0\%$ と低く、その範囲は0.0~67.2%と大きく変動した。野生のタイマイの平均ふ化率は、メキシコ合衆国ユカタン半島での観察事例では87~92% ($n = 455$, Xavier *et al.*, 2006), 西インド諸島グアドループ島 $85.6 \pm 13.4\%$ ($n = 86$, Kamel and Delcroix, 2009), サモア独立国ウポル島 $71.1 \pm 21.7\%$ ($n = 23$, Witzell and Banner, 1980), キューバ群島 $65.8 \sim 71.2\%$ ($n = 390$, Moncada, 1999), セイシェル共和国クーザン島では 64.3% ($n = 256$, Hitchins *et al.*, 2004) とそれぞれ報告されており、本研究の飼育個体よりも明らかに高い。アオウミガメの場合は同じ方法で卵を管理しても、野生個体が産卵した卵の方が飼育個体のものよりもふ化率が高かったと報告されている (Simon and Ulrich, 1975)。また、ケンブリメウミガメでは放流した仔ガメが天然海域で10年以上経過した後に産卵した卵のふ化率は、野生個体と比較して大差なかった。しかし、放流せずに飼育条件下で成熟するまで養成した個体が産卵した卵のふ化率は、野生個体よりも低いとの報告がある (Shaver and Wibbels, 2007)。これらのことから、飼育条件下で養成した雌が産卵した卵のふ化率が野生個体のものよりも低いという傾向は、養成したウミガメ類に共通した特性の一つである可能性が高い。飼育条件下では餌料や環境条件が野生個体とは大きく異なることから、そのことがふ化率低下の一因となっている可能性があり、今後はふ化率の低下に関する要因を究明する必要がある。

本研究におけるふ化仔ガメの大きさは、平均直甲長 37.5 ± 1.7 mm, 平均体重は 12.9 ± 0.6 gであった。一方、野生個体の場合、セイシェル共和国クーザン島の個体の体重は $15.3 \sim 15.5$ g ($n = 31$, Wood, 1986), オーストラリアキャンベル島では平均直甲長 $41.1 \pm$

0.1 mm および平均体重 14.3 ± 1.1 g ($n = 70$, Limpus *et al.*, 1983), キューバ群島では平均直甲長 40.1 ± 0.5 mm ($n = 500$, Moncada, 1999), サモア独立国ウボル島では平均直甲長 39.6 ± 0.1 mm および平均体重 12.7 ± 0.5 g ($n = 23$, Witzell and Banner, 1980), マレーシアでは平均直甲長 37.4 ± 1.3 mm および平均体重 11.4 ± 0.9 g ($n = 186$, Pilcher and Ali, 1999)であった。また, Márquez (1990) が取りまとめた世界の主要な産卵地での本種のふ化仔ガメの大きさの範囲は, 直甲長が38~46 mm, 体重が8.0~17.9 g と地域によってばらつきがみられた。これら野生個体のデータと比較すると, 飼育個体の大きさは野生個体の地域間の差の範囲内に収まっている。

本研究の結果, 飼育条件下におけるタイマイの交尾時間および交尾から初回産卵に至るまでの日数など, 野外調査では得にくい貴重な交尾生態に関する知見を明らかにすることができた。また, 産卵生態に関しては, 飼育個体の産卵数, 産卵間隔, 産卵回数は野生個体のものと差はなく, 飼育条件下であっても野生個体の産卵生態と比較して大きな違いは認められなかった。さらに, ふ化仔ガメの直甲長や体重も野生個体の事例と比較して差がなかった。このことは絶滅に瀕しているタイマイの保護増殖に人工繁殖が活用できる可能性を示している。

第4章 総合考察

産卵個体数が極めて少ない日本において, タイマイの資源回復を図るためには保護対策だけでなく, 人工繁殖によるヘッドスターティングが必要である。しかし, 本種の人工繁殖に関する研究は, 一部の研究機関で実施されているものの, その研究成果はほとんど公表されていない。また, 人工繁殖の技術を開発するためには, 本種の繁殖生理や繁殖生態に関する知見が不可欠であるが, 産卵やふ化に関する野外調査の報告事例は多くあるものの, それ以外の性ホルモンの動態や交尾行動などの知見はほとんど報告されていない。そこで, 本研究では本種の飼育条件下における繁殖に関する生態, 行動および生理学的な調査を行った。

第1章と第2章では, 雄14頭と雌11頭の血漿テストステロン濃度と血漿エストラジオール-17 β 濃度の季節変動を調査するとともに, 雄では交尾行動や二次性徴との関連を, 雌では卵胞の発達との関連を, それぞれ調べた。その結果, 成熟した雄の血漿テストステロン濃度は4~5月に大きく上昇し, またいずれの成熟個体も交尾行動を示した。一方, 成熟した雌の血漿エストラジオール-17 β 濃度は4~8月にかけて濃度

の大きな上昇がみられ, 卵胞は成熟個体でのみ観察され, 血漿エストラジオール-17 β 濃度の上昇に伴って発達した。さらに, 本研究において雌雄が交尾に成功した時期は, 4~5月の間であった(第3章)。以上の結果により, 本研究では4~5月をタイマイの交尾期と定義する。本研究でみられたテストステロンやエストラジオール-17 β の濃度が交尾期前から増加して交尾期にピークを迎えるという増減パターンは, 野生のウミガメ類(アカウミガメ; Wibbels *et al.*, 1987; Wibbels *et al.*, 1990, アオウミガメ; Jessop *et al.*, 2004; Wibbels *et al.*, 1990; Al-Habsi *et al.*, 2006, オサガメ; Rostal *et al.*, 1996, タイマイ; Dobbs *et al.*, 2007)や飼育条件下のウミガメ類(アオウミガメ; Licht *et al.*, 1979; Licht *et al.*, 1985, ケンプヒメウミガメ; Rostal, 2005)にも共通してみられる現象である。このことから, 本研究に用いた成熟した雄と雌の血漿テストステロンと血漿エストラジオール-17 β は, 正常に分泌されていると推測された。そして, これら性ホルモンの増減パターンを指標として雌雄の繁殖周期を調べると, 雄の繁殖周期は毎年であることが明らかとなった。一方, 雌の血漿エストラジオール-17 β 濃度の増減パターンは個体によって異なり, 成熟個体4頭中3頭は野生個体と同様に2~3年の繁殖周期であったが, 1頭は毎年増減するパターンを示し, 2006年と2007年には2年連続して産卵した。このことは, 本種の雌は毎年成熟して産卵できる能力を有していることを示唆している。現在は複数の雌を数年おきに交尾に用いているが, 毎年成熟させるための飼育条件を明らかにすることができれば, 人工繁殖の効率を高めることが可能になるので今後の課題であろう。

人工繁殖を行うためには, 養成している個体の中から成熟個体を選別して交尾させる必要がある。本研究では, 雄の性成熟個体を判定する方法として, 雄の二次性徴の一つである尻尾の伸長に着目し, 直甲長に対する尻尾の長さの比率“TE”による判別を試みた(第1章)。前述した雄の血漿テストステロンと交尾行動やTEとの関係を調べた結果, TEが0.35以上の個体は成熟個体, 0.33以下の個体は未成熟個体として明瞭に区分され, TEは簡便に雄の性成熟度を判別する有効な指標であることを明らかにした。このことから, 交尾に使用する雄は, TEを指標として性成熟した個体を選別することができ, また前述したように雄の繁殖周期が毎年であることから, 性成熟後の雄は毎年交尾に使用することが可能である。一方, 雌は二次性徴に伴う外部形態の変化がないことから, 雄のように簡便に性成熟度を判定する指標は見いだせなかった。また, 前述したように雌の繁殖周期は必ずしも毎年では

ないことから、性成熟した個体であっても、雄のように毎年交尾に供する個体として使用することはできない。したがって、交尾に使用する雌は、毎年交尾期前に血漿エストラジオール-17 β 濃度の測定や超音波診断装置を用いた卵胞の観察を行い、濃度の上昇や卵胞径の増大などを指標として選別する必要がある。

成熟した雄はいずれも雌に対して交尾行動を示したが（第1章）、雌は雄の交尾を受け入れる場合と回避する場合が観察され、また交尾に成功した事例であっても、交尾に成功したとき以外は、雄が交尾しようと雌に接近すると、雌は雄を威嚇して交尾を回避する行動を示した（第2章）。Booth and Peters (1972) は、野外調査においてアオウミガメの雌が雄の交尾を回避する行動を観察している。また、アオウミガメでは雌が雄の交尾を受け入れる期間、いわゆる“Heat period”は2～16日間であったと報告されている（Wood and Wood, 1980; Comuzzie and Owens, 1990）。これら既存の研究結果は、ウミガメ類の交尾の成否は雌が雄の交尾を受け入れるか否かが重要であり、さらに雌が雄の交尾を受け入れる期間は非常に短いことを示唆している。本研究では、2006～2009年の4年間で交尾に成功した事例は5事例あり、その時期は4～5月の間であった。データ数が少なかつたため本研究の結果には記載していないが、2009年に雌2頭を用いて定期的に交尾試験を行ったところ、Heat periodが9日以下であることが示唆された（小林真人、未発表）。しかし、各個体のHeat periodがいつであるかということ特定することはできなかった。したがって、交尾を確実に成功させるためには、Heat periodが含まれる4～5月の期間、常に成熟した雌雄を同居させておく必要がある。このHeat periodを決定する要因については、本研究では明らかにできなかった。飼育条件が本研究と異なる場合、Heat periodも異なり、4～5月に成熟した雌雄を同居させても交尾に失敗するかもしれない。したがって、交尾をより安定的に行うためには、Heat periodの決定要因を明らかにすることが重要である。また、本研究では性ホルモンの分泌を制御する環境要因（水温、日長）については調査していない。他のウミガメ類の飼育条件下の事例においても水温や光周期は自然条件であり、これら環境要因と成熟や交尾との関連については言及されていない（アオウミガメ：Licht *et al.*, 1979; Licht *et al.*, 1985, ケンブヒメウミガメ：Rostal, 2005）。性ホルモンと環境要因との関係を明らかにできれば、環境制御によって成熟の時期を任意にコントロールすることが可能となり、Heat periodの決定要因の解明にも役立つと思われる。

第3章では、2006～2009年に交尾に成功した雌の産卵生態と得られた卵のふ化率やふ化仔ガメの大きさを取りまとめ、既存の野生のタイマイの調査結果と比較した。その結果、産卵生態（産卵数、産卵間隔、産卵回数）は野生個体の事例と比較して大きな差はなく、飼育条件下であっても正常な産卵を行うことが明らかとなった。また、本研究で得られたふ化仔ガメの直甲長と体重は、野生個体の事例と比較して大きな差はなかった。しかし、ふ化率は野生個体の報告例と比較して著しく低かったことから、ここではふ化率が低かった原因について考察する。飼育条件下のアオウミガメ（Simon and Ulrich, 1975）やケンブヒメウミガメ（Shaver and Wibbels, 2007）のふ化率は、野生個体と比較して低いことが報告されており、飼育条件下のウミガメ類のふ化率は野生個体よりも低いことが示唆されている（Owens, 2000）。飼育条件下でウミガメに与えられる餌料は、アオウミガメでは配合飼料と海草（Simon *et al.*, 1975）、ケンブヒメウミガメでは魚やイカ（Rostal, 2005）であった。また、本研究に用いたタイマイにはカタクチイワシやイカを給餌した。しかし、野生のアオウミガメは海草類を主食とし、ケンブヒメウミガメは底生生物の中でもカニ類を主に摂餌し、タイマイは海綿動物を主食としている（Spotila, 2004）。このように養成されているウミガメ類は、いずれも本来の食性とは異なる餌料を給餌されており、Craven *et al.* (2008) は配合飼料で飼育したアオウミガメと野生のアオウミガメの卵に含まれる脂肪酸組成には違いがあることを報告している。このことは、餌料が卵の栄養成分に影響を及ぼすことを示唆しており、飼育条件下のウミガメ類のふ化率が低い要因の一つとして、餌料に由来する卵質が影響している可能性がある。いくら採卵できてもふ化率が低ければ放流に必要な仔ガメを確保することは困難になることから、この問題は人工繁殖を行う上で、第一に解決すべき重要な課題である。

本種のテストステロンやエストラジオール-17 β の季節変動を2年以上の長期にわたって明らかにし、交尾行動、繁殖周期、卵胞の発達などに関連付けた研究はこれまでにはなく、本研究で得られた結果は本種の人工繁殖の技術開発だけでなく、本種の保護対策を策定するための基礎的な知見としても有益である。また、本研究で明らかとなった本種の繁殖生態や繁殖生理をもとに、人工繁殖の技術を開発することができ、2006年からは毎年1～2頭の雌から採卵することに成功している。このことは、絶滅の危機に瀕している本種の資源回復だけでなく、存亡の危機に直面している日本の伝統工芸であるべつ甲産業を救済するための国内に

におけるタイマイ養殖事業の創出への道を開く成果である。

謝 辞

本研究の実施ならびに本論文の作成にあたり、懇切なるご指導とご校閲をいただいた独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所石垣支所 與世田兼三博士（現 瀬戸内海区水産研究所 増養殖部長）に感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、ご校閲ならびに貴重なお助言をいただいた西海区水産研究所石垣支所 奥澤公一博士（現 増養殖研究所）、長崎大学環東シナ海海洋環境資源研究センター 征矢野 清教授に厚くお礼を申し上げます。

タイマイの増養殖に関する研究開発は、1999年に当時の社団法人日本栽培漁業協会八重山事業場で取り組みが開始され、2003年からは独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所八重山栽培漁業センター（現 西海区水産研究所亜熱帯研究センター）で今日まで継続して実施されており、本研究の成果は10年以上の長期にわたって蓄積された研究結果の賜です。これまでにタイマイの増養殖に関する研究開発に携われた多くの職員の方々のご努力に敬意を表するとともに、本研究を進めるにあたりご協力をいただいた西海区水産研究所八重山栽培技術開発センター栽培技術研究室（現 西海区水産研究所亜熱帯研究センター八重山庁舎）の職員各位に対し、この場を借りてお礼申し上げます。

文 献

- Ackerman R.A., 1997 : The nest environment and the embryonic development of sea turtles, in "The Biology of Sea Turtles" (ed. by Lutz P.L. and Musick J.A.), CRC press, Florida, pp.83-106.
- 阿部寧, 南浩史, 2008 : 海亀類の混獲回避対策－ウミガメ個体群の状況と包括的アプローチ. 日本水産学会誌, **74**, 234-236.
- Bell C.D., and Parsons J., 2002 : Cayman turtle farm head-starting project yields tangible success. Marine Turtle Newsletter, **98**, 5-6.
- Beyneto S., and Delcroix E., 2005 : Underwater oviposition by a hawksbill turtle in Guadeloupe, French West Indies. Marine Turtle Newsletter, **107**, 14.
- Bjorndal K.A., Carr A., Meylan A.B., and Mortimer J.A., 1985 : Reproductive biology of the hawksbill *Eretmochelys imbricata* at Tortuguero, Costa Rica, with notes on the ecology of the species in the Caribbean. Biological Conservation, **34**, 353-368.
- Bjorndal K.A., Meylan A.B., and Turner B.J., 1983 : Sea turtles nesting at Melbourne beach, Florida. I. size, growth and reproductive biology. Biological Conservation, **26**, 65-77.
- Boulon R.H., 1983 : Some notes on the population biology of green *Chelonia mydas* and hawksbill *Eretmochelys imbricata* turtles in the northern U.S. Virgin Islands:1981-83. NMFS Grant Report No. NA82-GA-A-00044, National Marine Fisheries Service, Washington D.C.
- Bourne A.R., and Licht P., 1985 : Steroid biosynthesis in turtle testes. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, **81**, 793-796.
- Canin J., 1991 : International trade aspects of the Japanese hawksbill shell ('Bekko') industry. Marine Turtle Newsletter, **54**, 17-21.
- Casares M., Rübel A., and Honegger R.E., 1997 : Observations on the female reproductive cycle of captive giant tortoises (*Geochelone spp.*) using ultrasound scanning. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, **28**, 267-273.
- Comussie D.K.C., and Owens D.W., 1990 : A quantitative analysis of courtship behavior in captive green sea turtles (*Chelonia mydas*). Herpetologica, **46**, 195-202.
- Craven K.S., Parsons J., Taylor S.A., Belcher C.N., and Owens D.W., 2008 : The influence of diet on fatty acids in the egg yolk of green sea turtles, *Chelonia mydas*. Journal of Comparative Physiology B, **178**, 495-500.
- Dobbs K.A., Miller J.D., Owens D.W., and Landry A.M., 2007 : Serum testosterone and estradiol-17 β levels during the peak period in a year-round hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* L. nesting population. Pacific Conservation Biology, **13**, 151-157.
- Fontaine C., and Shaver D.J., 2005 : Head-starting the Kemp's ridley sea turtle, *Lepidochelys kempii*, at the NMFS Galveston laboratory, 1978-1992: a review. Chelonian Conservation and Biology, **4**, 838-845.
- Gilman C.A., and Wolf B.O., 2007 : Using portable ultrasonography as a non-destructive method for

- estimating reproductive effort in lizards. The Journal of experimental biology, **210**, 1859-1867.
- Heck J., MacKenzie D.S., Rostal D., Medler K., and Owens D., 1997 : Estrogen induction of plasma vitellogenin in the Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). General and Comparative Endocrinology, **107**, 280-288.
- Hitchins P.M., Bourquin O., and Hitchins S., 2004 : Nesting success of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) on Cousine Island, Seychelles. Journal of Zoology, **264**, 383-389.
- Ho S., 1987 : Endocrinology of vitellogenesis, in "Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles" (ed. by Norris D.O., Jones R.E.), Plenum Press, New York, pp.145-169.
- Huff J.A., 1989 : Florida (USA) terminates "head-start" program. Marine Turtle Newsletter, **46**, 1-2.
- Jessop T.S., Limpus C.J., and Whittier J.M., 2004 : Comparison of plasma androgen profiles in green and hawksbill sea turtles inhabiting Queensland waters. Australian Journal of Zoology, **52**, 293-301.
- Joaquin B.B., 1980 : Attempts of protect hawksbills in a Venezuelan National Park. Marine Turtle Newsletter, **14**, 4-5.
- Kamel S.J., and Delcroix E., 2009 : Nesting ecology of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Guadeloupe, French West Indies from 2000-07. Journal of Herpetology, **43**, 367-376.
- Kamezaki N., 1989 : The nesting sites of sea turtles in the Ryukyu Archipelago and Taiwan. Current Herpetology in East Asia, 342-348.
- Kime D.E., 1987 : The steroids, in "Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology" (ed. by Chester-Jones I., Ingleton P.M., Philips J.G.), Plenum Press, New York, pp.3-56.
- Kobayashi M., Shimizu T., Yoseda K., 2006 : Mating and nesting behavior of hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in captivity. Proceedings of the 3rd International Symposium on SEASTAR2000 and Asian Bio-logging Science, Kyoto University, Kyoto, pp.13-15.
- Lance A.V., Rostal D.C., Elsey R.M., and Trosclair P.L., Ultrasonography of reproductive structures and hormonal correlates of follicular development in female American alligators, *Alligator mississippiensis*, in southwest Louisiana. General and Comparative Endocrinology, **162**, 51-256.
- Licht P., Wood J.F., Owens D.W., and Wood F.E., 1979 : Serum gonadotropins and steroids associated with breeding activities in the green sea turtle *Chelonia mydas*. General and Comparative Endocrinology, **39**, 274-289.
- Licht P., Owens D.W., Clifton K., and Renaflores C., Changes in LH and progesterone associated with the nesting cycle and ovulation in the olive ridley sea turtle, *Lepidochelys olivacea*. General and Comparative Endocrinology, **48**, 247-253.
- Licht P., Wood J.F., and Wood F.E., 1985 : Annual and diurnal cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male green sea turtle *Chelonia mydas*. General and Comparative Endocrinology, **57**, 35-344.
- Limpus C.J., 1992 : The hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Queensland: population structure within a southern Great Barrier Reef feeding ground. Wildlife Research, **19**, 489-506.
- Limps C.J., and Reed P., 1985 : The loggerhead turtle, *Caretta caretta*, in Queensland: observation on interesting behavior. Australian Wildlife Research, **12**, 535-540.
- Limpus C.J., Miller J.D., Baker V., and McLachlan E., 1983 : The hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata* (L.), in north-eastern Australia: the Campbell Island rookery. Australian Wildlife Research, **10**, 185-197.
- Lutcavage M.E., Plotkin P., Witherington B., Lutz P.L., 1997 : Human impacts on sea turtle survival, in "The Biology of Sea Turtles" (ed. by Lutz P.L., Musick J.A.), CRC press, Florida, pp.387-409.
- Márquez M.R., 1990 : FAO species catalogue, Vol.11 sea turtles of the world. An Annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date, FAO, Rome.
- Meylan A.B., and Donnelly M., 1999 : Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN red list of threatened animals. Chelonian Conservation and Biology, **3**, 200-224.
- Meylan A.B., 1999 : International movements of immature and adult hawksbill turtles

- (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean region. *Chelonian Conservation and Biology*, **3**, 189-194.
- Miller J.D. Reproduction in sea turtles, in "The Biology of Sea Turtles" (ed. by Lutz P.L., Musick J.A.), CRC press, Florida, 387-409.
- Moncada F., Carrillo E., Saenz A., and Nodarse G., 1999 : Reproduction and nesting of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the Cuban Archipelago. *Chelonian Conservation and Biology*, **3**, 257-263.
- 中古賀文樹, 亀崎直樹, 岩瀬文人, 1994 : ウミガメは減っているか〜その保護と未来〜, 第1版, 紀伊半島ウミガメ情報交換会, 和歌山, pp.24-27.
- Owens D.W., 1980 : The comparative reproductive physiology of sea turtles. *American Zoologist*, **20**, 549-563.
- Owens D.W., 1997 : Hormones in the life history of sea turtles, in "The Biology of Sea Turtles" (ed. by Lutz P.L., Musick J.A.), CRC press, Florida, pp.315-341.
- Owens D.W., 1999 : Reproductive cycles and endocrinology, in "Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles No.4" (ed. by Eckert K., Bjorndal K.A., Abreu-Grobois F.A., Donnelly M.), Consolidated Graphic Communications, Pennsylvania, pp.119-123.
- Owens D.W., 2000 : Reproductive problems in captive and wild sea turtles, in "Proceedings of the eighteenth international sea turtle symposium" (compile by Abreu-Grobois F.A., Briseño-Dueñas R., Márquez R., Sarti L.), U.S. Department of Commerce NOAA technical Memorandum NMFS-SEFSC-436, pp.2.
- Owens D.W., and Morris Y.A., 1985 : The comparative endocrinology of sea turtles, *Copeia*, **5**, 723-735.
- Pilcher N.J., and Ali L., 1999 : Reproductive biology of the hawksbill turtles, *Eretmochelys imbricata*, in Sabah Malaysia. *Chelonian Conservation and Biology*, **3**, 330-336.
- Pritchard P.C.H., 1997 : Evolution, phylogeny, and current status, in "The Biology of Sea Turtles" (ed. by Lutz P.L., Musick J.A.), CRC press, Florida, pp.1-28.
- Rérez-Castañeda R., Salum-Fares A., Defeo O., 2007 : Reproductive pattern of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in sandy beaches of Yucatan Peninsula. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **87**, 815-824.
- Rostal D.C., 2005 : Seasonal reproductive biology of the Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*): comparison of captive and wild population. *Chelonian Conservation and Biology*, **4**, 788-800.
- Rostal D.C., Grumbles J.S., Palmer K.S., Lance V.A., Spotila J.R., and Paladino F.V., 2001 : Changes in gonadal adrenal steroid levels in the leatherback sea turtle (*Dermochelys coriacea*) during the nesting cycle. *General and Comparative Endocrinology*, **122**, 139-147.
- Rostal D.C., Paladino F.V., Patterson R.M., and Spotila J.R., 1996 : Reproductive physiology of nesting leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) at Las Baulas National Park, Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology*, **2**, pp.230-236.
- Rostal D.C., Robeck T.R., Owens D.W., and Kraemer D.C., 1990 : Ultrasound imaging of ovaries and eggs in Kemp's ridley sea turtles (*Lepidochelys kempii*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **21**, 267-273.
- Sato F., and Madriasau B.B., 2001 : Preliminary report on natural reproduction of hawksbill sea turtle in Palau. *Marine Turtle Newsletter*, **55**, 12-14.
- Shaver D.J., and Wibbels T., : Head-starting the Kemp's ridley sea turtle, in "Biology and conservation of ridley sea turtles" (ed. by Plotkin P.T.), The Johns Hopkins University Press, Maryland., pp.297-323.
- Shimizu T., Asami K., Yamamoto K., Dan S., Yoseda K., 2005 : Successful spontaneous nesting of the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) at Yaeyama station, National Center for Stock Enhancement, Japan. *Proceedings of the 2nd International Symposium on SEASTAR2000 and Asian Bio-logging Science*, Kyoto University, Kyoto, pp.69-74.
- Simon M.H., Ulrich G.F., and Parkes A.S., 1975 : The green sea turtle (*Chelonia mydas*): mating, nesting, and hatching on a farm. *Journal of Zoology*, **177**, 411-423.

- Solomon S.E., Baird T., 1979 : Aspects of the biology *Chelonia mydas* L. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, **17**, 347-361.
- Spotila J.R., 2001 : Sea turtles: a complete guide to their biology, behavior, and conservation. Johns Hopkins University Press, Maryland.
- Steiner T., 2001 : Guest editorial: Japan hawksbill import ban-too early to rest on our laurels! Marine Turtle Newsletter, **56**, 24-26.
- 社団法人水産資源保護協会, 1998 : 日本の希少な野生水生生物に関するデータブック (水産庁編), 社団法人水産資源保護協会, 東京, pp.236-245.
- Tucker A.D., and Limpus C.J., 1997 : Assessment of reproductive status in Australian freshwater crocodiles (*Crocodylus johnstoni*) by ultrasound imaging. Copeia, **4**, 851-857.
- Uchida I., Nishiwaki M., 1982 : Sea turtles in the waters adjacent to Japan, in "Biology and Conservation of Sea Turtles" (ed. by Bjorndal K.), Smithsonian Institution Press, Washington D.C., pp.317-319.
- Ulrich G.F., and Parkes A.S., 1978 : The green sea turtle (*Chelonia mydas*): further observations on breeding in captivity. Journal of Zoology, **185**, 237-251.
- ウミガメ保護ハンドブック (2007), 第7版, 特定非営利活動法人日本ウミガメ協議会, 大阪, pp.12.
- van Dam R.P., and Diez C.E., 1998 : Caribbean hawksbill turtle morphometrics. Bulletin of Marine Science, **62**, 145-155.
- van Dam R.P., and Diez C.E., 1997 : Home range of immature hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata* (Linnaeus)) at two Caribbean Island. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **220**, 15-24.
- Whittier J.H., Corrie F., and Limpus C.J., Plasma steroid profiles in nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Queensland, Australia: Relationship to nesting episode and season. General and Comparative Endocrinology, **106**, 39-47.
- Wibbels T., Owens D.W., and Amoss M.S., 1987 : Seasonal changes in the serum testosterone titers of loggerhead sea turtles captured along the Atlantic coast of the United States, in "NOAA Technical Report NMFS 53 Ecology of East Florida Sea turtles" (ed. by Witzell W.N.), National Fisheries Service, Washington D.C., pp.59-64.
- Wibbels T., Owens D.W., Limpus C.J., Reed P.C., and Amoss M.S., 1990 : Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). General and Comparative Endocrinology, **79**, 154-164.
- Witzell W.N., 1985 : Variation of size maturity of female hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*), with speculations on life-history tactics relative to proper stock management. Japanese Journal of Herpetology, **11**, 46-51.
- Witzell W.N., and Banner A.C., 1980 : The hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in Western Samoa. Bulletin of Marine Science, **30**, 571-579.
- Wood V.E., 1986 : Breeding success of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* at Cousin Island, Seychelles and the implications for their conservation. Biological Conservation, **37**, 321-332.
- Wood J.R., Wood F.E., 1980 : Reproductive biology of captive green sea turtles *Chelonia mydas*. American Zoologist, **20**, 499-505.
- Xavier R., Barata A., Cortez P.L., Queiroz N., and Cuevas E., 2006 : Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata* Linnaeus 1766) and green turtle (*Chelonia mydas* Linnaeus 1754) nesting activity (2002-2004) at el Cuyo beach, Mexico. Amphibia Reptilia, **27**, 539-547.
- 與世田兼三, 清水智仁, 2006 : 希少種であるウミガメ類の産卵, ふ化管理および放流技術の開発, 日本水産学会誌, **72**, 476-479.

透明・光るメダカ (*olvas-GFP/STII-YI* 系統) を用いた
内分泌かく乱化学物質の影響評価に関する研究
羽野健志 (瀬戸内海区水産研究所)

化学物質は現代社会にとって極めて重要であるが、それらの中には生物の内分泌系に作用して発生や生殖等に影響を与える物質 (内分泌かく乱化学物質) が存在することが明らかにされており、その影響評価が急務となっている。一般的に内分泌かく乱化学物質による性分化・再生産への影響を評価する場合、多数の実験動物を用いて長期間の曝露・飼育を実施した後、生殖腺組織を観察する等、多大な労力と時間を必要とするため、これらの影響を迅速かつ少ないコストと犠牲で検出できる試験系の開発が求められている。

本研究では、体表に色素が殆ど存在しない透明なメダカ (STII 系統) に、生殖細胞で常時発現する *vasa* 遺伝子の調節領域に緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) を結合したトランスジーン (*olvas-GFP*) を導入した生殖腺が光るトランスジェニックメダカ (*olvas-GFP/STII-YI* 系統) を用い、内分泌かく乱化学物質の影響評価系への適用を検討した。

最初に、無処理のふ化後 1, 5, 10, 15 日令 *olvas-GFP/STII-YI* 系統仔魚を用い、蛍光顕微鏡および画像解析装置により生殖腺の GFP 蛍光面積を測定するとともに、生殖腺部位を取り出して GFP 蛍光を持つ生殖細胞数を調べた。その結果、ふ化後 1 日令から遺伝的メスの GFP 蛍光面積および生殖細胞数は遺伝的オスに比べ有意に増加し、10 日令では約 10 倍となっていた。よって、性分化の過程で生じる雌雄の差異を、10 日令仔魚の生殖腺の GFP 蛍光面積を測定することにより生きた状態で観察可能であると結論した。

次に、女性ホルモン様作用を持ち自然界の河川において検出例が多数報告されているエチニルエストラジオール (EE_2) を、ナノインジェクション法により受精直後の胚に微量注入 (0, 0.1, 0.5, 2.5, 5.0 ng/egg) し、性分化への影響を生殖細胞の観察により調べた。その結果、0.5 ng/egg 以上の処理区で 10 日令仔魚の遺伝的オスの中に生殖細胞数、蛍光面積ともに対照区遺伝的オスの 6-10 倍と遺伝的メスと同等にまで増加した個体が観察された。さらに、仔魚を 100 日令成魚まで飼育して生殖腺組織を調べたところ、0.5 ng/egg 以上の処理区の遺伝的オスが卵巣を持ち、表現型がメスとなる現象、つまり、オスからメスへの性転換が観察された。よって、 EE_2 が性分化異常を引き起こす作用は、10 日令仔魚生殖腺の GFP 蛍光面積を測定することにより迅速かつ簡便に検出可能であることが示唆された。また、ふ化直後の

olvas-GFP/STII-YI 系統仔魚に EE_2 を 35 日間飼育水から曝露 (0, 25.2, 45.1, 80.1, 158, 447, 880, 1710 ng/L) し生殖腺組織を観察した結果、158 ng/L の 10 日令オスで蛍光面積が有意に増加した。さらに、35 日令では、45.1 ng/L 以上の処理区の遺伝的オスで卵巣を持つ個体が見られ、メスへの性転換が起こっていた。

同様に女性ホルモン様作用を持ち汚染が報告されているノニルフェノール (NP) を受精直後の胚に注入 (0, 2.0, 10, 50, 125, 250 ng/egg) した結果、全ての処理区で 10 日令仔魚の蛍光面積、100 日令成魚ともに遺伝子型の性と表現型の性は一致しており、性分化異常は観察されなかった。これは、NP の女性ホルモン様作用が弱い、もしくは NP がメダカ体内で代謝、排泄されたためと考察した。

さらに EE_2 による *olvas-GFP/STII-YI* 系統の成熟した生殖腺への影響を調べるため、60 日令成魚を EE_2 (0, 47.8, 94.8, 216, 522 ng/L) に 4 週間飼育水から曝露後、生殖腺 GFP 蛍光面積の測定を行った結果、遺伝的オスでは 216 ng/L 以上の処理区で蛍光面積が開始時の約 30% にまで減少していた。その生殖腺組織を観察した結果、精巣は萎縮して結合組織が大部分を占めており、再生産に大きな障害が予想される状態であった。また EE_2 濃度依存的に精巣に卵母細胞が見られた。遺伝的メスでも、卵巣の蛍光面積は 522 ng/L 区で曝露開始時の約 50% にまで減少していた。次に、60 日令オス成魚を EE_2 (0, 43.7, 85.8, 215, 473 ng/L) に 3 週間曝露した後、清水下で 6 週間飼育して同一個体における生殖腺蛍光面積の変化を経時的に観察した。その結果、曝露 3 週目には 215 ng/L 区以上で精巣の蛍光面積は 25% にまで減少したが、清水飼育終了時の精巣の蛍光面積は曝露開始時の値にまで回復した。組織観察の結果では、結合組織は殆どなく正常な精子形成が観察され精巣の回復が確認された。

以上の研究の結果、*olvas-GFP/STII-YI* 系統を用いてその生殖腺の GFP 蛍光画像を解析することにより、化学物質の生殖腺の発達と分化に及ぼす害作用を生きた状態で検出可能であることが明らかとなった。また成熟した生殖腺への影響および清水飼育による回復過程の観察も同一個体で可能となった。*olvas-GFP/STII-YI* 系統は、内分泌かく乱化学物質の影響評価やそのメカニズムを解明する上で有用なモデルになるものと期待される。

クルマエビのホワイトスポット病 WSD (white spot disease) の防除対策に関する研究

佐藤 純 (増養殖研究所 上浦庁舎)

WSD は、クルマエビ種苗生産過程あるいは養殖生産過程において被害をもたらすウイルス感染症である。元来抗体を持たない無脊椎動物のワクチン開発は無意味であると考えられて来たが、感染耐過クルマエビが WSD 原因ウイルスである WSSV (white spot syndrome virus) の再感染に対しある程度の特異性を有する抵抗性を獲得することが解明された (免疫様現象)。本研究では、これらの免疫様現象を利用したより積極的な水平伝感染除技術の開発を目的の一つとした。第 1 章では、種苗生産過程における WSSV の感染経路を検討し、種苗生産過程における WSSV の主たる感染経路は垂直感染の可能性が高いと判断した。第 2 章では種苗生産過程において実施される受精卵のヨード剤による消毒の安全性と効果について検討し、クルマエビの受精卵は 128 細胞期においてハンドリングの影響を受けやすいことを確認した。また、ヨウ素濃度 5 mg/L で 5 分の処理が安全であり、安全な処理条件で卵表面の生菌数を 90% 以上減させた。第 3、4 章では大腸菌発現の WSSV の rVP26 と rVP28 の経口投与ワクチンの有効性を検討した。その結果、経口攻撃、浸漬攻撃および注射攻撃の何れにおいても防御効果が確認できた。特に、経口攻撃試験で高い防御効果が得られたことは、共食いによる水平的な感染の拡大を特徴とする WSD の実用的な防除対策の一つになると考えた。

以上、現時点で考えられる最も有効な防除対策技術を取りまとめると、1. 親エビの選抜、2. 卵消毒、3. 飼育水の管理、飼育水の殺菌管理が難しくなる天然海面を利用した養殖生産過程での対策としては、生体防御能を利用した水平感染対策が考えられ、rVPs の経口投与とブースターの必要性について検討したところ、WSSV に対する防御効果が誘導できること、さらに誘導される防御反応の発現時期および持続期間も明らかにした。

飼育条件下におけるタイマイの繁殖に関する生態、行動および生理学的研究

小林真人

(西海区水産研究所亜熱帯研究センター八重山庁舎)

本研究の対象種であるタイマイ *Eretmochelys imbricata* は、ウミガメ科に属するウミガメ類の 1 種で、主に熱帯から亜熱帯のサンゴ礁海域に生息してい

る。日本における本種の分布は伊豆半島以南であるが、産卵の北限は南西諸島であり、その産卵個体数は非常に少ない。本種は、古くからタンパク源の一つとして肉や卵が食用に供されてきただけでなく、剥製や甲羅を用いた工芸品 (日本ではべっ甲細工) の原料としても世界各地で利用されてきた。しかし、乱獲などによって生息数は減少し、本種は国際自然保護連合のレッドリストの絶滅危惧 I A 類に記載されている。また、本種をはじめとしたウミガメ類の保護対策の一環として、ワシントン条約によって国際的な商取引が禁止されている。そして、このことによって日本のべっ甲産業は原料の調達が不可能となり、存亡の危機に直面している。このようなことを背景として、1999 年から独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所石垣支所は人工飼育した仔ガメの放流 (Head-Starting) による本種資源の回復を目指し、本種の増殖技術の研究開発を開始した。Head-Starting を行うためには、安定的な採卵と仔ガメの確保が不可欠であり、そのためには親ガメの繁殖機構を解明することが重要である。そこで、本研究は飼育条件下における本種の繁殖生理や繁殖生態を解明することを目的とした。

第 1 章では、雄の血漿テストステロン濃度の変動と交尾行動を調べ、性成熟とテストステロン濃度との関係を明らかにし、雄の繁殖周期は毎年であることがわかった。また、直甲長、尻尾の長さ、TE (直甲長に対する尻尾の長さの比率) などの外部形態を指標として雄の性成熟の状態を調べたところ、TE を指標とすることで簡便に雄の性成熟を判定できることがわかった。

第 2 章では、雌の血漿エストラジオール- 17β 濃度の変動と卵巣の発達状態を調べ、エストラジオール- 17β 濃度と卵巣の発達の関係を明らかにした。また、雌の繁殖周期は野生個体と同様に 2~3 年であることが、飼育条件によっては毎年成熟できる可能性があることが示唆された。

第 3 章では、2006 年から 2009 年にかけて雌の繁殖生態を調べ、産卵数、産卵回数、産卵間隔、ふ化仔ガメの大きさは、野生タイマイの既存の報告例と大きな違いは認められなかったが、ふ化率は野生個体の事例よりも著しく低いことが明らかになった。

第 4 章では、第 1 章から第 3 章までの結果をもとに総合考察を行った。飼育条件下のタイマイの性ホルモンの動態は、野生個体のものと同様の変動パターンを示し、飼育条件下であっても正常に性ホルモンが分泌されていることがわかった。交尾期は 4 月下旬から 5 月であったが、雌が雄の交尾を受け入れる期間は短いことが示唆された。このことから、確実に交尾をさせ

るためにはこの期間を逃さずに雌雄を同居させて交尾させる必要がある。交尾からふ化までの繁殖生態は、野生個体の報告事例と大きな差はなかったものの、飼

育条件下ではふ化率が非常に低いことが明らかとなった。今後タイマイの増養殖をさらに推進するためには、ふ化率を向上させる研究が急務である。

水産総合研究センター研究報告

Bulletin of Fisheries Research Agency

編集委員会

編集委員長 高柳和史

編集委員 鈴木満平, 岸田 達, 横山雅仁, 中田 薫, 谷津明彦, 小谷祐一, 中嶋員洋,
本多 仁, 中山一郎, 武内智行, 伊藤文成, 川崎 清, 皆川 恵, 堀川博史

平成24年1月31日 発行

発行所 独立行政法人 水産総合研究センター

〒220-6115 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3 クィーンズタワー B 15階

Fisheries Research Agency

Queen's Tower B 15F, 2-3-3, Minato mirai, Nishi-ku, Yokohama, Kanagawa.

220-6115 Japan

<http://www.fra.affrc.go.jp>

発行者 松里壽彦

印刷所 日昇印刷株式会社

ISSN 1346-9894

BULLETIN OF FISHERIES RESEARCH AGENCY

No. **36**
January 2012

Bull. Fish. Res. Agen.

CONTENTS

Doctoral Thesis

Studies on the evaluation of the effect of endocrine disrupting chemicals using transgenic see-through medaka (<i>Oryzias latipes</i>), <i>olvas-GFP/STII-YI</i> strain Takeshi HANO.....	1
Studies on prevention measure of white spot disease of kuruma shrimp <i>Marsupenaeus japonicus</i> Jun SATOH.....	57
Ecological, Behavioral, and Physiological Evidence of the Hawksbill Turtle Reproduction in Captivity Masato KOBAYASHI.....	107
Abstract (JAPANESE).....	143